

VALTER T. MOTTA

BIOQUÍMICA BÁSICA

---

# Fosforilação Oxidativa

# 8

## Fosforilação Oxidativa

### Objetivos

1. Ordenar os componentes da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, de acordo com seus potenciais redox.
2. Calcular a energia livre padrão da oxidação de um composto, dado o potencial redox padrão.
3. Comparar a energia livre padrão de oxidação de um mol de  $\text{FADH}_2$  e de 1 mol de  $\text{NADH}$  na cadeia respiratória, até a formação de  $\text{H}_2\text{O}$ .
4. Explicar como a energia da oxidação de substâncias pode ser utilizada para a síntese de ATP.
5. Explicar a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa através da hipótese quimiosmótica.
6. Comparar os efeitos de um inibidor da oxidação, de um inibidor da fosforilação e de um desacoplador, sobre o consumo de oxigênio e sobre a produção de ATP.
7. Explicar os mecanismos do estresse oxidativo

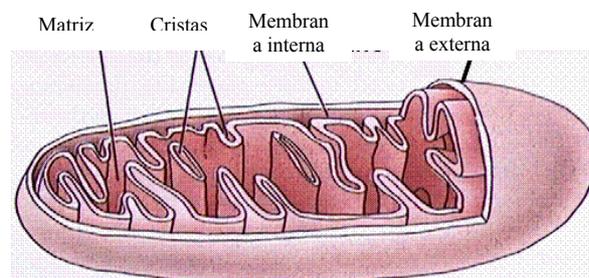
A degradação de moléculas nutrientes gera um número reduzido de moléculas de ATP diretamente pela fosforilação ao nível do substrato. No entanto, as etapas oxidativas da glicólise, ciclo ácido cítrico,  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e da degradação de alguns aminoácidos produzem ATP indiretamente. Isso ocorre pela reoxidação das coenzimas  $\text{NADH}$  e  $\text{FADH}_2$  formadas pela oxidação de macromoléculas e que transferem seus elétrons para o  $\text{O}_2$  por meio da *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons*. A cadeia é formada por complexos protéicos (centros redox) localizados na membrana mitocondrial interna e ligados firmemente a grupos prostéticos capazes de aceitar e doar elétrons (reações de oxidação-redução). Grande parte da energia liberada no sistema bombeia prótons para fora da matriz mitocondrial, gerando um gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$ . O retorno dos prótons para a matriz mitocondrial libera energia livre que é canalizada para a síntese de ATP a partir de ADP e  $\text{P}_i$ , por meio da *fosforilação oxidativa*. Essa é a maior fonte de ATP nas células eucarióticas. Existe um estreito acoplamento entre a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons e a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. O ATP é um transdutor energético universal dos sistemas vivos que é utilizado na condução da maioria das reações dependentes de energia.

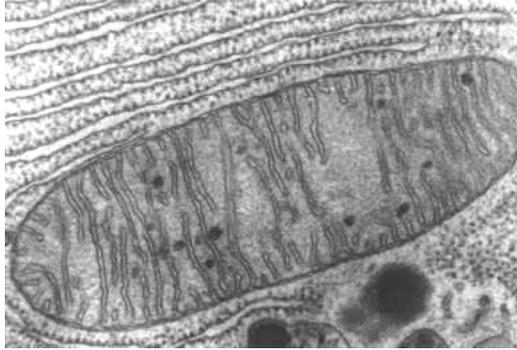
As necessidades energéticas diárias de um homem de 70 kg em ocupação sedentária é, aproximadamente, 10.000 kJ. A energia livre padrão de hidrólise do ATP é  $-30,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Esse indivíduo deve, portanto, hidrolizar o equivalente a 328 moléculas ou 165 kg de ATP por dia, no entanto, o corpo contém somente cerca de 50 g de ATP. O cálculo sugere que cada molécula de ATP é sintetizada e desfosforilada mais de 3.000 vezes a cada 24 horas para suprir de energia as atividades do organismo. O atendimento da maior parte dessas necessidades tem lugar na membrana mitocondrial interna e é realizada por dois sistemas acoplados: a *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons* e a *fosforilação oxidativa*.

## 8.1 Estrutura mitocondrial

Os processos de liberação e conservação da maior parte de energia livre nas células aeróbicas são realizados nas mitocôndrias. O número de mitocôndrias em diferentes tecidos reflete a função fisiológica do mesmo e determina a capacidade de realizar funções metabólicas aeróbicas. O eritrócito, por exemplo, não possui mitocôndrias e, portanto, não apresenta a capacidade de liberar energia usando o oxigênio como aceptor terminal de elétrons. Por outro lado, a célula cardíaca apresenta metade de seu volume citosólico composto de mitocôndrias e é altamente dependente dos processos aeróbicos.

A mitocôndria é formada por duas membranas com diferentes propriedades e funções biológicas. A membrana externa lisa é composta de lipídeos (fosfolipídeos e colesterol) e proteínas, com poucas funções enzimáticas e de transporte. Contém unidades da proteína *porina*, que formam canais transmembrana onde ocorre a livre difusão de vários íons e de moléculas pequenas.





**Figura 8.1**

Mitocôndria. (a) *Acima*: diagrama de um corte de uma mitocôndria. (b) *Abaixo*: microfotografia eletrônica

A membrana mitocondrial interna é composta de 75% de proteínas e contém as enzimas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa. Contém também, enzimas e sistemas de transporte que controlam a transferência de metabólitos entre o citosol e a matriz mitocondrial. Ao contrário da membrana externa, a interna é virtualmente impermeável para a maioria das moléculas polares pequenas e íons. A impermeabilidade da membrana mitocondrial interna promove a compartimentalização das funções metabólicas entre o citosol e a mitocôndria. Os compostos se movem através da membrana mitocondrial mediados por proteínas específicas denominadas *carreadores* ou *translocases*. A membrana mitocondrial interna apresenta pregas voltadas para o interior (circunvoluções), chamadas *cristas* que aumentam a superfície da membrana e cujo número reflete a atividade respiratória da célula.

O espaço entre a membrana externa e a membrana interna é conhecido como *espaço intermembranas* e é equivalente ao citosol quanto às suas concentrações em metabólitos e íons. A região delimitada pela membrana interna é denominada *matriz mitocondrial*.

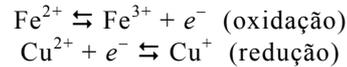
Os principais características bioquímicas das mitocôndrias são:

- *Membrana externa*. Livremente permeável a moléculas pequenas e íons.
- *Membrana interna*. Impermeável à maioria das moléculas pequenas e íons, incluindo o  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , ATP, ADP,  $Ca^{2+}$ ,  $P_i$ , o piruvato, etc. A membrana contém: cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, ADP-ATP-translocases, ATP-sintase ( $F_0F_1$ ) e outros transportadores de membrana.
- *Matriz mitocondrial*. Contém: complexo da piruvato-desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, enzimas da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, enzimas da oxidação dos aminoácidos, várias outras enzimas, ribossomos, DNA, ATP, ADP,  $P_i$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  e outros substratos solúveis.

## 8.2 Reações de oxidação-redução

As reações de oxidação-redução (reações redox) envolvem a transferência de elétrons que passam de um *doador de elétrons* (redutor) para um *aceptor de elétrons* (oxidante). Portanto, a

oxidação é a perda de elétrons, enquanto, a redução é o ganho de elétrons. Nenhuma substância pode doar elétrons sem que outra os receba. Assim, uma reação de oxidação-redução total é composta de *duas meias-reações* acopladas (uma reação de oxidação e uma reação de redução) e constituem um *par redox*:



Em algumas reações de oxidação-redução são transferidos tanto elétrons como prótons (átomos de hidrogênio):



A tendência com a qual um doador de elétrons (reductor) perde seus elétrons para um aceptor eletrônico (oxidante) é expressa quantitativamente pelo potencial de redução do sistema. O *potencial-padrão de redução* ( $E^{\circ}$ ) é definido como a *força eletromotiva* (fem), em volts (V), gerado por uma meia-célula onde os dois membros do par redox conjugado são comparados a uma meia-célula referência padrão de hidrogênio ( $2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{H}_2$ ) a 25°C e 1 atm sob condições padrão. O potencial-padrão da meia reação do hidrogênio em pH 7,0 é  $E^{\circ} = -0,42$  V (volts). A Tabela 8.1 apresenta os valores de potenciais-padrão de redução de alguns pares redox.

**Tabela 8.1** – Potenciais-padrão de redução ( $E^{\circ}$ ) de algumas reações parciais bioquímicas.

Par redox	$E^{\circ}$ (V)
$\text{Succinato} + \text{CO}_2 + 2e^{-} \rightleftharpoons \alpha\text{-cetoglutarato}$	-0,67
$2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{H}_2$	-0,42
$\alpha\text{-Cetoglutarato} + \text{CO}_2 + \text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{isocitrato}$	-0,38
$\text{Acetoacetato} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \beta\text{-hidroxibutirato}$	-0,35
$\text{NAD}^{+} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{NADH} + \text{H}^{+}$	-0,32
$\text{Lipoato} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{diidrolipoato}$	-0,29
$\text{Acetaldeído} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{etanol}$	-0,20
$\text{Piruvato} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{lactato}$	-0,19
$\text{Oxaloacetato} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{malato}$	-0,17
$\text{Coenzima Q (oxid)} + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{coenzima Q (red)}$	0,10
$\text{Citocromo } b \text{ (Fe}^{3+}) + e^{-} \rightleftharpoons \text{citocromo } b \text{ (Fe}^{2+})$	0,12
$\text{Citocromo } c \text{ (Fe}^{3+}) + e^{-} \rightleftharpoons \text{citocromo } c \text{ (Fe}^{2+})$	0,22
$\text{Citocromo } a \text{ (Fe}^{3+}) + e^{-} \rightleftharpoons \text{citocromo } a \text{ (Fe}^{2+})$	0,29
$\text{Citocromo } a_3 \text{ (Fe}^{3+}) + e^{-} \rightleftharpoons \text{citocromo } a_3 \text{ (Fe}^{2+})$	0,39
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{H}^{+} + 2e^{-} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$	0,82

Quanto maior o potencial-padrão de redução, maior a afinidade da forma oxidada do par redox em aceitar elétrons e, assim, tornar-se reduzida.

O potencial de redução depende das concentrações das espécies oxidadas e reduzidas. O potencial de redução ( $E$ ) está relacionado com o potencial-padrão de redução ( $E^{\circ}$ ) pela equação de Nernst (proposta em 1881):

$$E' = E^{\circ'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{receptor de elétrons}]}{[\text{doador de elétrons}]}$$

onde  $E'$  = potencial de redução para as concentrações encontradas na célula em pH 7,0,  $E^{\circ'}$  = potencial-padrão de redução,  $R$  = constante dos gases ( $8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $T$  = temperatura absoluta em graus K (Kelvin)( $298\text{K}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ),  $n$  = número de elétrons transferidos,  $F$  = constante de Faraday ( $96.485 \text{ J V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , é a carga elétrica de 1 mol de eletrons) e  $\ln$  = logaritmo natural. A  $25^{\circ}\text{C}$ , esta equação se reduz a:

$$E' = E^{\circ'} + \frac{59}{n} \log \frac{[\text{receptor de elétrons}]}{[\text{doador de elétrons}]}$$

Onde  $E'$  e  $E^{\circ'}$  são expressos em V (volts).

A energia disponível para a realização de trabalho é proporcional a  $\Delta E$  (diferença nos potenciais de redução). Quando o valor de  $\Delta E$  for positivo,  $\Delta G$  será negativa e indica um processo espontâneo e pode produzir trabalho.

### 8.3 Cadeia mitocondrial transportadora de elétrons

Nas células eucarióticas o estágio final da oxidação de nutrientes ocorre na mitocôndria. A organela promove a rápida oxidação do NADH e  $\text{FADH}_2$  produzidos nas reações de glicólise, ciclo do ácido cítrico,  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e oxidação de alguns aminoácidos. A transferência de elétrons do NADH e  $\text{FADH}_2$  para  $\text{O}_2$  se realiza em uma sequência de reações de oxidorredução em processo denominado *cadeia mitocondrial transportadora de elétrons* (CMTE) também conhecido como cadeia respiratória. A cadeia consiste de uma série de transportadores de elétrons que operam sequencialmente, formados por proteínas integrais de membranas associadas a grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar elétrons. Os elétrons passam através dessa cadeia do menor para o maior potencial-padrão de redução. Na medida que os elétrons são transferidos ao longo da cadeia, ocorre a liberação de energia livre suficiente para sintetizar ATP a partir do ADP e  $\text{P}_i$  por meio da *fosforilação oxidativa*.

Os componentes da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons estão localizados na *superfície interna da membrana mitocondrial interna* por onde os elétrons provenientes do NADH e  $\text{FADH}_2$  fluem para o oxigênio molecular. Os transportadores de elétrons funcionam em complexos multienzimáticos conhecidos como *NADH-coenzima Q oxidorreductase* (complexo I), *succinato-coenzima Q oxidorreductase* (complexo II), *coenzima Q-citocromo c oxidorreductase* (complexo III) e *citocromo c oxidase* (complexo IV). Os grupos prostéticos transportadores de elétrons associados aos complexos protéicos são: *nucleotídeos da nicotinamida* ( $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$ ), *nucleotídeos da flavina* (FMN ou FAD), *ubiquinona* (coenzima Q), *citocromos* e *proteínas ferro-enxofre*.

#### **$\text{NAD}^+$ , $\text{NADP}^+$ e FAD**

Apesar das estruturas do NADH e NADPH serem semelhantes, suas funções diferem consideravelmente. O NADH é reconvertido a  $\text{NAD}^+$  na cadeia respiratória mitocondrial transportadora de elétrons, fundamentalmente para a geração de ATP. O NADPH fornece íons hidretos para a maioria dos processos sintéticos. Neste contexto é examinado somente a reoxidação do NADH na cadeia respiratória mitocondrial.

**Tabela 8.2** – Características dos componentes protéicos da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons

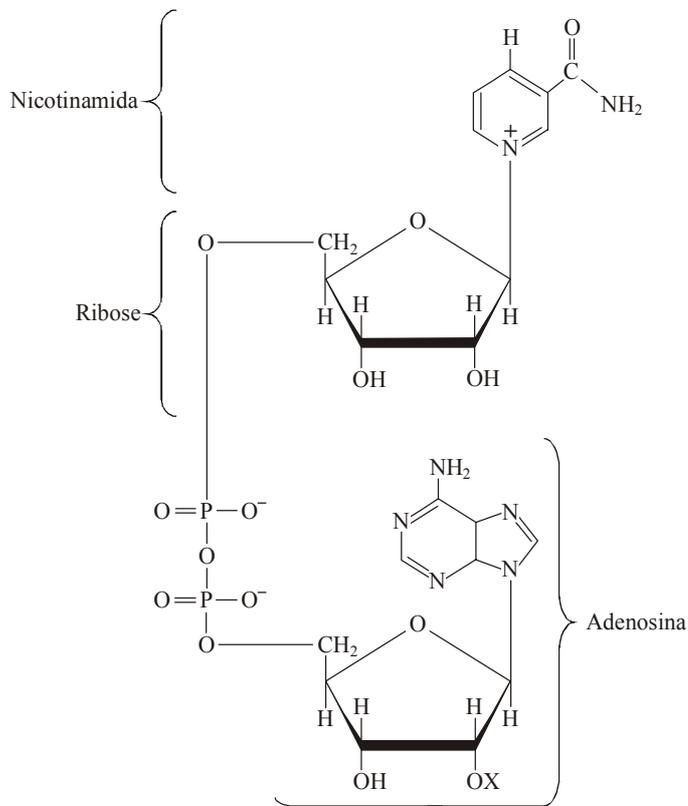
Complexo enzimático	Grupo prostético
I (NADH-coenzima Q oxidorreductase)	FMN, FeS*
II (Succinato-coenzima Q oxidorreductase)	FAD, FeS
III (Coenzima Q-citocromo <i>c</i> oxidorreductase)	Citocromo <i>b</i> Citocromo <i>c</i> <sub>1</sub> 1 FeS <sub>R</sub> **
IV (Citocromo <i>c</i> oxidase)	Citocromo <i>a</i> Citocromo <i>a</i> <sub>3</sub> Cu <sub>A</sub> , Cu <sub>B</sub>

\*FeS = grupo ferro-enzofre.

\*\*FeS<sub>R</sub> = centro de Rieske

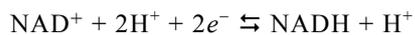
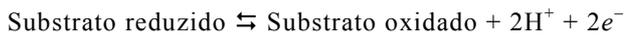
### A. Complexo I transfere elétrons do NADH para a ubiquinona

A transferência de elétrons através da cadeia respiratória inicia com o complexo I (também chamado NADH-coenzima Q oxidorreductase ou NADH desidrogenase) catalisa a transferência de dois elétrons do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) para a coenzima Q (ubiquinona). As principais fontes de NADH incluem reações do ciclo do ácido cítrico e da oxidação dos ácidos graxos. Composto por 43 cadeias polipeptídicas diferentes, o complexo I é a maior proteína transportadora de elétrons. Além de uma molécula de FMN (flavina mononucleotídeo), o complexo contém sete centros ferro-enzofre (FeS). Os centros ferro-enzofre podem consistir de dois ou quatro átomos de ferro complexado com igual número de íons sulfeto, mediam a transferência de um elétron. As proteínas que contêm centros ferro-enzofre são também conhecidas como *ferro-proteínas sem heme*.

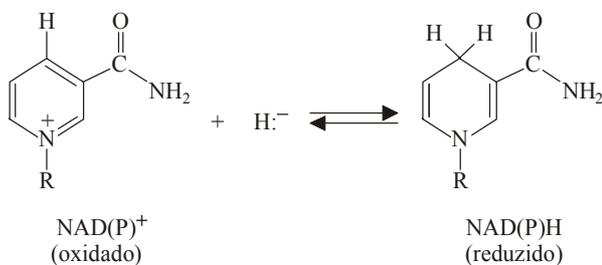


X = H Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>)  
 X = PO<sub>3</sub><sup>-</sup> Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP<sup>+</sup>)

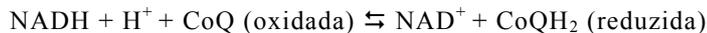
As reações catalisadas pelas desidrogenases são exemplificadas esquematicamente pelas equações:



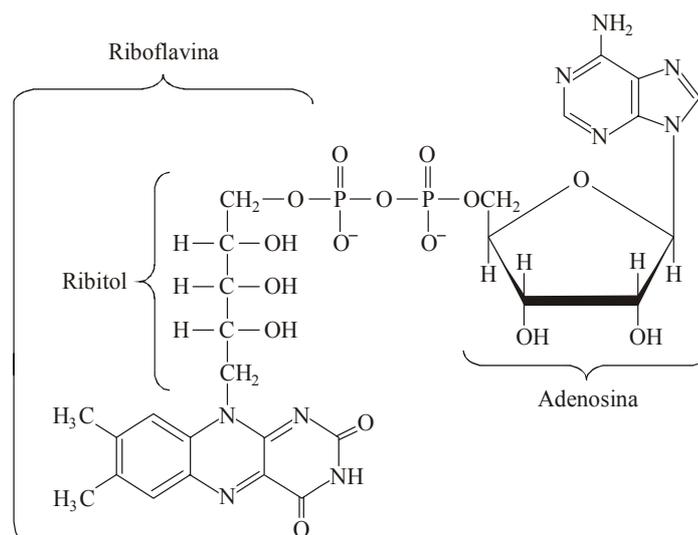
Esta reação envolve a transferência reversível de dois prótons + dois elétrons do substrato para o NAD<sup>+</sup>. Um próton (H<sup>+</sup>) é liberado para o meio e o *ion hidreto*, :H<sup>-</sup> (um próton + dois elétrons), é incorporado na posição 4 do anel de nicotimanida do NAD<sup>+</sup>:



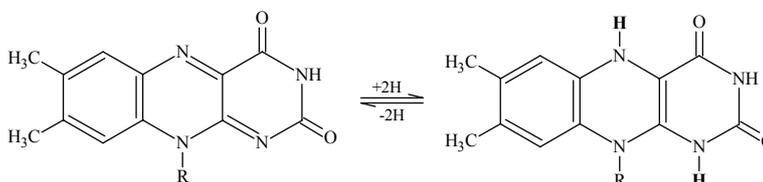
O NADH é oxidado a NAD<sup>+</sup> pela ação do *Complexo I* com a transferência de + 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup> para a *coenzima Q* (*CoQ* ou *ubiquinona*) na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons:



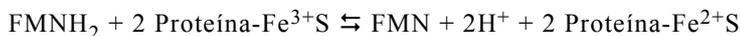
A transferência envolve várias etapas intermediárias que ainda não foram completamente esclarecidas. Os elétrons são transferidos inicialmente do NADH para a FMN, um dos grupos prostéticos da enzima, para produzir a forma reduzida FMNH<sub>2</sub>.



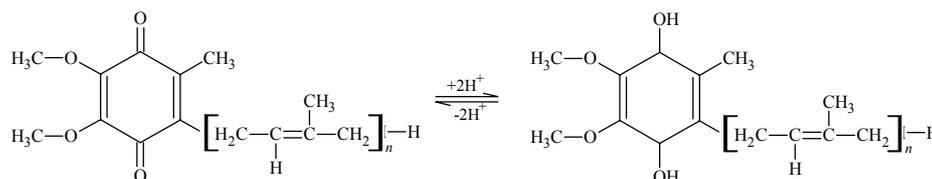
Flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD)



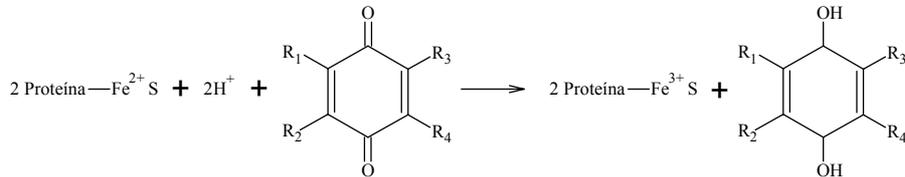
A seguir os elétrons são transferidos da FMNH<sub>2</sub> para uma série de *proteínas ferro-enzôfre* (FeS) cujos grupos mais comuns são 2Fe-2S e 4Fe-4S. O estado oxidado férrico (Fe<sup>3+</sup>) dos grupos capta os elétrons da FMNH<sub>2</sub> com a liberação de prótons conforme a equação:



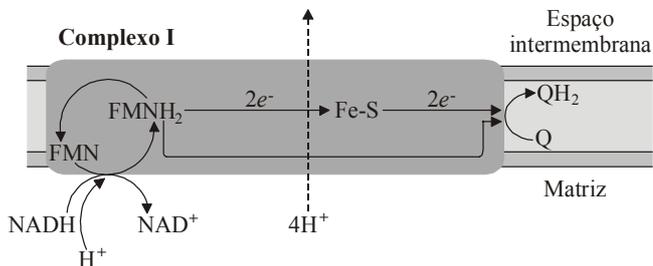
As proteínas ferro-enzôfre reduzidas são reoxidadas pela *coenzima Q* (CoQ), um pequeno composto lipossolúvel presente em virtualmente todos os sistemas vivos. A CoQ aceita elétrons das flavoproteínas e é reduzida a CoQH<sub>2</sub> em reação reversível de transferência de elétrons:



A reação seguinte mostra a reoxidação das proteínas ferro-enzôfre na cadeia respiratória mitocondrial pela coenzima Q:



Durante a transferência de dois elétrons através dos centros redox do Complexo I, quatro prótons são translocados da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana.



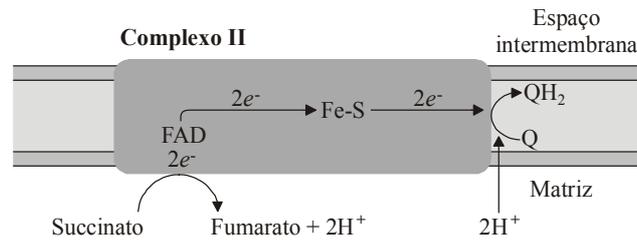
**Figura 8.2**

Fluxo de elétrons e prótons por meio do Complexo I. Os elétrons passam do NADH para a coenzima Q por vários centros ferro-enzôfre. A redução do Q a QH<sub>2</sub> também necessita de dois prótons. Quatro prótons são transferidos da matriz para o espaço intermembrana. O fluxo de prótons gera um potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna que conserva parte da energia liberada pelas reações de transferência de prótons para a síntese de ATP.

## B. Succinato-coenzima Q oxidoredutase (Complexo II)

Uma via independente do Complexo I, permite a entrada de elétrons de potencial relativamente alto na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, utilizando o complexo *succinato-coenzima Q oxidoredutase (complexo II)* que também catalisa a redução da CoQ a CoQH<sub>2</sub>. Os grupos redox incluem o FAD (*flavina adenina dinucleotídeo*), proteínas Fe-S e o citocromo *b*<sub>560</sub>. O FADH<sub>2</sub> é formado no ciclo do ácido cítrico pela oxidação do succinato a fumarato em presença da enzima *succinato-desidrogenase*, pertencente ao complexo II. Desse modo, o FADH<sub>2</sub> produzido não deixa o complexo, mas seus elétrons são transferidos para as proteínas ferro-enzôfre e a seguir para a CoQ para entrar na cadeia. Do mesmo modo, o FADH<sub>2</sub> da *glicerol-fosfato-desidrogenase* e *acil-CoA-desidrogenase* transferem seus elétrons de alto potencial para a CoQ formando CoQH<sub>2</sub>. O complexo II não bombeia prótons através da membrana mitocondrial, pois a variação de energia livre é insuficiente. Em consequência, forma-se menos ATP pela oxidação do FADH<sub>2</sub> que pela do NADH (*ver adiante*).

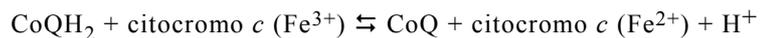
Apesar dos nomes, os complexos I e II não operam em série, mas ambos atingem o mesmo resultado.

**Figura 8.3**

Fluxo de elétrons por meio do Complexo II. Os elétrons do succinato passam por uma flavoproteína e várias centros FeS para atingir o Q. O complexo II não contribui diretamente para gradiente de concentração mas serve para suprir de elétrons a cadeia mitocondrial de transporte.

### C. Complexo III transfere elétrons da CoQH<sub>2</sub> para o citocromo c

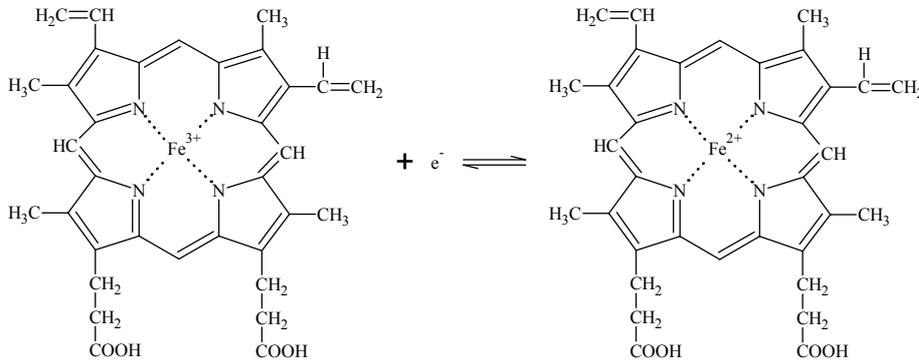
O complexo III (coenzima Q-citocromo c oxidorreductase ou citocromo bc<sub>1</sub>) catalisa a transferência de elétrons da CoQH<sub>2</sub> para o citocromo c com o transporte de prótons da matriz para o espaço intermembranas.



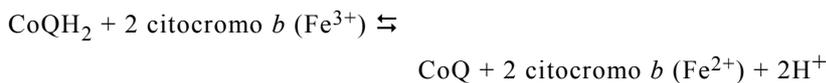
O complexo enzimático é formado no mínimo por oito proteínas diferentes, incluindo dois *citocromos b* (tipos *b*<sub>562</sub> e *b*<sub>566</sub>) que apresentam potenciais de oxidorredução diferentes, um *citocromo c*<sub>1</sub> e uma proteína ferro-enxôfre. Devido a essa composição, o complexo III as vezes é denominado complexo citocromo bc<sub>1</sub>.

Nos organismos aeróbicos as funções geradoras de energia possuem vários citocromos, localizados na membrana mitocondrial interna. Os citocromos são proteínas transportadoras de elétrons caracterizadas pela presença de um grupo *heme* (ferro-protoporfirina) como grupo prostético. As porfirinas são compostos tetrapirrólicos que permitem numerosas variações em sua estrutura, dependendo dos substituintes no núcleo pirrólico e de suas disposições específicas. No decorrer dos ciclos catalíticos, os átomos de ferro dos citocromos oscilam entre o estado oxidado férrico (Fe<sup>3+</sup>), e o estado reduzido ferroso (Fe<sup>2+</sup>). Os citocromos são classificados pela natureza das cadeias laterais do grupo heme em três classes principais, denominadas *a*, *b* e *c*.

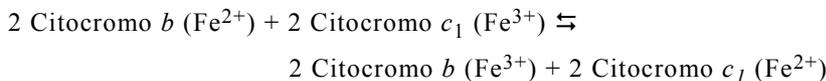
A CoQ reduzida é reoxidada pelo *citocromo b*. O centro reagente deste intermediário redox é o átomo de ferro do complexo porfirínico:



Quando o citocromo *b* atua como agente oxidante, o átomo de ferro é convertido de  $\text{Fe}^{3+}$  (férrico) para  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso). Ou seja, cada molécula de citocromo *b* aceita um elétron. Como a oxidação da  $\text{CoQH}_2$  envolve a remoção de dois elétrons (e dois prótons), a completa oxidação de uma molécula deste intermediário necessita *duas* moléculas de citocromo *b*. Os prótons são liberados para o meio:

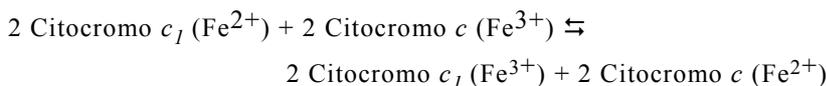


O citocromo *b* é, subsequentemente, oxidado pelo *citocromo c<sub>1</sub>*. O carreador, como todos os citocromos, é um complexo ferro-porfirina–proteína. Os citocromos diferem entre si com respeito tanto a porção protéica como à porfirínica. Entretanto, as reações redox de todos os citocromos envolvem a oxidação e redução do ferro:

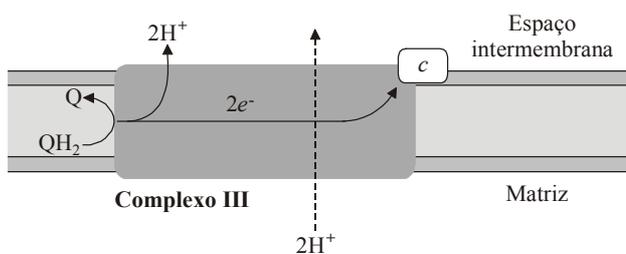


O citocromo *c<sub>1</sub>* reduzido transfere os elétrons para o *citocromo c*, uma proteína heme (protoporfirina IX) frouxamente ligada à cisteína da proteína na superfície interna da membrana.

Quando o citocromo *c* reage com o citocromo *c<sub>1</sub>* ocorre a transferência de elétrons entre os átomos de ferro:



A oxidação de uma molécula de  $\text{QH}_2$  é acompanhada pela translocação de *quatro* prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembrana (dois prótons da matriz e outros dois da  $\text{QH}_2$ ).

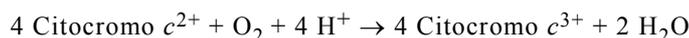


**Figura 8.4**  
Fluxo de transporte de elétrons e prótons por meio do Complexo III. Os

elétrons passam do QH<sub>2</sub> para o citocromo *c*. Quatro prótons são translocados através da membrana: dois da matriz e dois do QH<sub>2</sub>.

#### D. Complexo IV oxida o citocromo *c* e reduz o O<sub>2</sub>

O complexo IV (citocromo *c* oxidase) é um complexo protéico que catalisa a transferência de quatro elétrons do citocromo *c* até o oxigênio molecular para formar água:

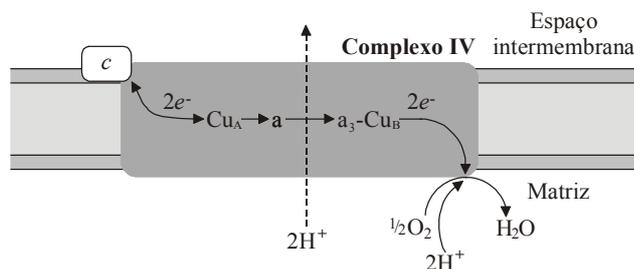


Os centros redox do complexo IV nos mamíferos incluem grupos heme e íons cobre situados entre as 13 subunidades em cada metade do complexo dimérico.

Cada elétron é transferido do citocromo *c* para o centro redox Cu<sub>A</sub>, que contém dois íons cobre, e então para o grupo heme *a*. A seguir, o elétron viaja para um centro binuclear que consiste do átomo de ferro do heme *a*<sub>3</sub> e um íon cobre (Cu<sub>B</sub>). A redução do O<sub>2</sub> pelos quatro elétrons ocorre no centro binuclear FeCu. A redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O consome quatro prótons da matriz mitocondrial.

A citocromo *c* oxidase também *transloca dois prótons* da matriz para o espaço intermembrana.

O mecanismo preciso desta fase não está totalmente esclarecido. A presença de íons de cobre é crítica para a transferência final dos elétrons para o oxigênio.



**Figura 8.5**

Fluxo de elétrons e prótons por meio do Complexo IV. Os átomos de ferro dos grupos heme no citocromo e os átomos de cobre são oxidados e reduzidos no fluxo de elétrons. O Complexo IV contribui para a concentração de prótons de dois modos: a translocação de prótons da matriz para o espaço intermembrana ocorre em associação com a transferência de elétrons e a formação de água remove prótons da matriz.

#### E. Energia livre da transferência dos elétrons do NADH para o O<sub>2</sub>

A medida de variação de energia livre das reações de oxido-redução é dependente da diferença de voltagem entre potenciais-padrão de redução,  $\Delta E^{\circ'}$ , do par redox:

$$\Delta E^{\circ'} = E^{\circ'} (\text{aceptor de elétrons}) - E^{\circ'} (\text{doador de elétrons})$$

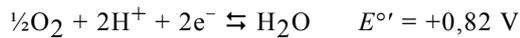
A variação de energia livre padrão para a reação é dada pela equação:

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

onde  $\Delta G^{\circ'}$  é a variação de energia livre padrão,  $n$  é o número de elétrons transferidos por mol de reagente convertido,  $F$  é a constante

de proporcionalidade *faraday* ( $1 F = 96.485 \text{ J} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), (um fator que converte volt/equivalente a joule/equivalente) e  $\Delta E^{\circ'}$  é a diferença entre os potenciais-padrão de redução do par redox.

Na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons dois elétrons são transferidos do NADH (doador de elétrons) através de uma série de aceptores de elétrons com potenciais de redução crescentes até o  $\text{O}_2$  (acceptor de elétrons). As reações parciais para a oxidação do NADH pelo  $\text{O}_2$  são expressas:



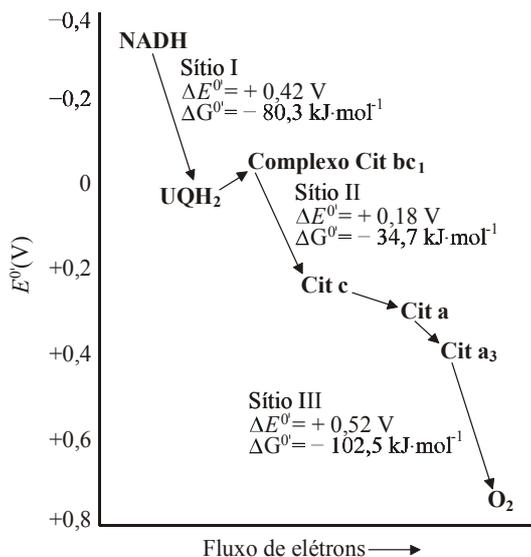
$$\Delta E^{\circ'} = +0,820 - (-0,320) \text{ mV} = +1,14 \text{ mV}$$

A variação de energia livre padrão é então dada por

$$\Delta G^{\circ'} = -2 \times 96.485 \times 1,14 \text{ V}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -218 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

A energia livre global liberada ( $-218 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) é suficiente para sintetizar ATP a partir de ADP e  $\text{P}_i$  por meio da *fosforilação oxidativa*.



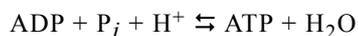
**Figura 8.6**

Relações energéticas na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. A redução na energia livre ocorre em três etapas. Em cada etapa (sítios I, II e III) a energia liberada é suficiente para a síntese de ATP.

## 8.4 Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo no qual a energia gerada pela cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (CMTE) é conservada na forma de ATP. O processo é responsável pela maioria do ATP sintetizado em organismos aeróbicos. O fluxo de elétrons pela CMTE, desde o par  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  até o par  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ , libera energia livre que é acoplada ao transporte de prótons por meio de uma

membrana impermeável ao próton, e é conservada como um potencial eletroquímico de membrana. O fluxo transembrana de prótons fornece energia livre para a síntese de ATP por meio da ATP-sintase a partir de ADP e  $P_i$ .



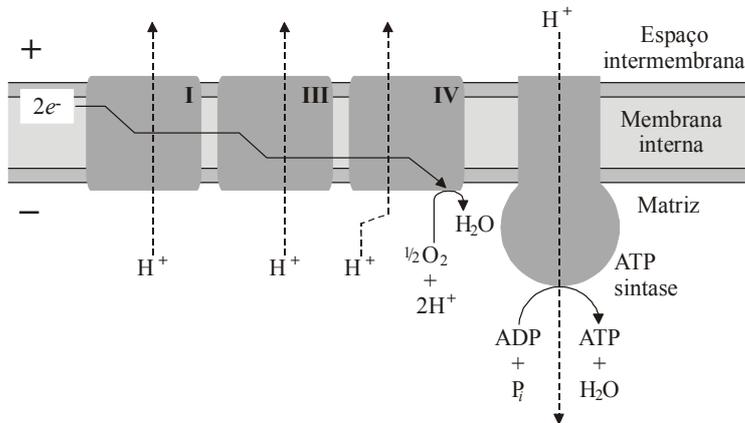
Apesar dos esforços realizados, ainda não foram identificados alguns intermediários da cadeia como também certas moléculas chamadas desacoladoras, que impedem a síntese de ATP durante o CMTE. Além disso, a hipótese não explica porque toda a membrana mitocondrial deve estar intacta durante a síntese de ATP.

Além da síntese de ATP, os gradientes de prótons gerados na CMTE são dissipados na produção de calor empregando outra via para os prótons retornarem para a matriz mitocondrial por meio de uma proteína existente nas membranas internas e chamada *proteína desacopladora* (termogenina), principalmente, no tecido adiposo marrom.

### A. Teoria quimiosmótica

Nas últimas décadas foram realizados significativos esforços para delinear o mecanismo da fosforilação oxidativa. Muitas hipóteses foram propostas, mas somente uma foi amplamente aceita e tem sido confirmada experimentalmente, a *teoria quimiosmótica* ou *propulsora de prótons* (proposta por Peter Mitchell em 1961) incorporada de elementos de outra proposta, a do *acoplamento conformacional* (1974).

A teoria postula que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão acoplados pelo gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. Neste modelo, *a energia livre do transporte de elétrons pela cadeia mitocondrial leva ao bombeamento de  $H^+$  (prótons) da matriz para o espaço intermembrana, estabelecendo um gradiente eletroquímico de  $H^+$  (força próton-motiva, pmf) através da membrana mitocondrial interna. Os  $H^+$  retornam para a matriz mitocondrial por meio de canais protéicos específicos formados pela enzima ATP-sintase (ver adiante) que é composta de duas unidades funcionais,  $F_0$  e  $F_1$ . A energia livre liberada pelo potencial eletroquímico desse gradiente é utilizada para a síntese de ATP a partir de ADP e  $P_i$ . Para cada NADH oxidado na matriz mitocondrial ~2,5 ATP são sintetizados, enquanto ~1,5 ATP são formados por  $FADH_2$  oxidado, já que seus elétrons entram na cadeia em  $CoQH_2$ , depois do primeiro sítio de bombeamento de prótons.*

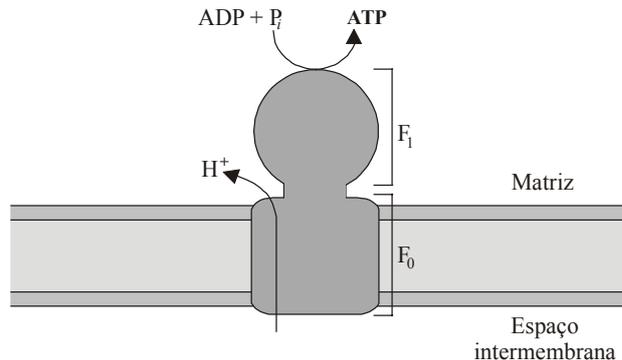
**Figura 8.7**

Acoplamento do transporte mitocondrial de elétrons e a síntese de ATP (teoria quimiosmótica). O transporte de elétrons movimenta os prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas estabelecendo um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. O retorno dos prótons para a matriz via  $F_0-F_1$  (ATP-sintase) e a geração de ATP é mostrada à esquerda da figura. A energia também é utilizada na translocação do  $Ca^{2+}$ .

## B. Síntese de ATP

O acoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese de ATP é obtido pelo gradiente eletroquímico. A síntese do ATP na mitocôndria é catalisada pelo complexo *ATP-sintase* (*ATP-sintase bombeadora de prótons*,  $F_0F_1$  *ATP-sintase*, *complexo V*) encontrada na membrana mitocondrial interna. É uma enzima multiprotéica composta por duas subunidades distintas: o  $F_1$  e o  $F_0$ . O componente  $F_1$  (fator de acoplamento I) é uma proteína periférica de membrana solúvel em água e formada por cinco diferentes subunidades polipeptídicas na proporção ( $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ). O componente  $F_0$  é um complexo proteico integral de membrana com oito diferentes tipos de subunidades e é insolúvel em água. O  $F_0$  é o canal transmembrana que transfere prótons para o sítio ativo da ATP-sintase. A unidade  $F_1$  catalisa a síntese de ATP em três sítios ativos. A porção  $F_0$  da ATP sintase é uma proteína integral de membrana formada por três ou quatro subunidades.

Quando o componente  $F_1$  está conectado ao componente  $F_0$ , a *ATP-sintase* ( $F_0F_1$ -ATPase) catalisa a síntese de ATP. No entanto, quando o componente  $F_1$  é liberado para a matriz mitocondrial ocorre uma ação contrária à sua função normal; ele catalisa a hidrólise do ATP (o reverso da síntese).

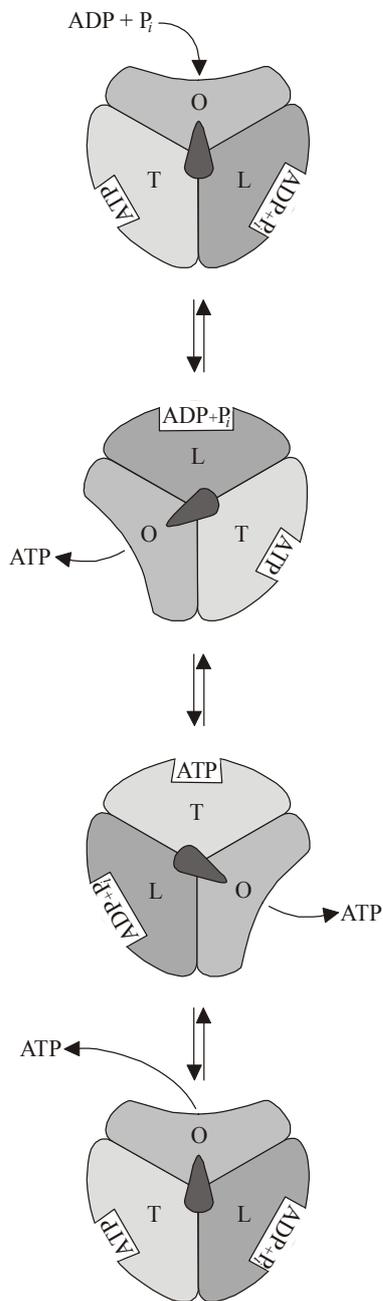
**Figura 8.8**

**Função da ATP-sintase.** Os prótons fluem através do canal transmembrana  $F_0$  do espaço intermembrana para a matriz; o componente  $F_1$  catalisa a síntese do ATP a partir do  $ADP + P_i$ .

O mecanismo da síntese de ATP a partir de ADP e  $P_i$  catalisada pela ATP-sintase foi proposto por Paul Boyer (1979) e consiste de *mecanismo de mudança da ligação* no qual os três sítios de  $F_1$  giram para catalisar a síntese. O mecanismo sugere que a energia não é empregada para formar a ligação fosfoanidro, mas para liberar o ATP do sítio ativo. No sítio ativo, o  $K_{eq}$  para a reação  $ADP + P_i \rightleftharpoons ATP + H_2O$  é perto de 1,0. Assim, a formação de ATP no sítio ativo é rapidamente completada. Contudo, ..... Uma mudança conformacional dirigida pelo influxo de prótons enfraquece a ligação do ATP com a enzima e, assim, o ATP recém-sintetizado deixa a superfície da enzima.

A formação e a liberação de ATP ocorre em três etapas:

1. Uma molécula de ADP e uma molécula de  $P_i$  ligam-se ao sítio O (aberto).
2. A passagem de prótons para o interior através da membrana mitocondrial interna causa mudanças na conformação dos sítios catalíticos. A conformação aberta (O) – contendo ADP e  $P_i$  recentemente ligado – torna-se um sítio frouxo (L). O sítio frouxo, já preenchido com ADP e  $P_i$ , torna-se um sítio firme (T). O sítio T contendo ATP converte-se em sítio O (aberto).
3. O ATP é liberado do sítio aberto; o ADP e  $P_i$ , condensam-se para formar ATP no sítio firme (T).

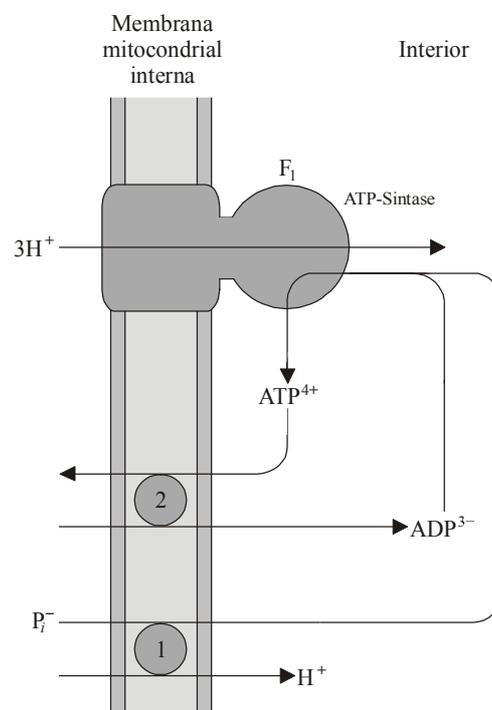


**Figura 8.3**  
**Mecanismo de mudança de ligação para ATP-sintase.** As diferentes conformações dos três sítios são indicados por diferentes formatos. O ADP e o  $P_i$  ligam-se ao sítio O. Uma alteração conformacional dependente de energia liberada na translocação de prótons interconverte os três sítios. O sítio O para L, T para O e O para L. O ATP é sintetizado no sítio T e liberado no sítio O.

### C. Transporte ativo do ATP, ADP e $P_i$ através da membrana mitocondrial

É necessário que o ATP recém-sintetizado saia da mitocôndria para a sua utilização no citosol, bem como o retorno do ADP para a produção de ATP na matriz mitocondrial. No entanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável a entrada de ADP e a saída de ATP. Para que essas moléculas atravessem a membrana é necessária a

presença da *ATP-ADP-translocase* (*translocador de ADP-ATP*) – uma proteína mitocondrial transportadora de íons e metabólitos carregados – que é impelida pelo potencial de membrana. A difusão dessas moléculas carregadas é realizada por um mecanismo de transporte acoplado, ou seja, a entrada de ADP na matriz está vinculada a saída de ATP, e vice-versa (sistema de *antiporte*). O segundo sistema de transporte de membrana é a *fosfato-translocase*, que promove a entrada de um  $P_i$  e um  $H^+$  (próton) para o interior da matriz (sistema de *simporte*  $P_i-H^+$ ), que atua em conjunto com a *ATP-ADP-translocase*. A ação combinada desses dois transportadores promove a troca do ADP e  $P_i$  citosólicos pelo ATP da matriz mitocondrial com o *ganho líquido de um  $H^+$*  no espaço intermembrana.



**Figura 8.11**

**Transporte de ATP, ADP e  $P_i$  através da membrana mitocondrial interna.**

A *ATP-ADP-translocase* (*translocador de ADP-ATP*) transporta o ATP recém-sintetizado para o citosol e ADP e  $P_i$  para dentro da matriz (*antiporte*). Notar que a troca de  $P_i$  e  $H^+$  é *simporte*. (1) *Fosfato-translocase* e (2) *ATP-ADP-translocase*.

A troca ATP-ADP gasta 25% do rendimento energético da transferência de elétrons na cadeia mitocondrial para regenerar o potencial de membrana.

**D. Número de ATP gerados via cadeia mitocondrial transportadora de elétrons**

A relação precisa entre o número de prótons que retornam para a matriz mitocondrial através da  $F_1-F_0$ -ATP sintase e o número de ATP gerados permanece incerto. Existe o consenso de que três prótons

voltam para a matriz para cada ATP gerado. Também acredita-se que o par de elétrons que entra na cadeia transportadora a partir do:

- *NADH* através dos Complexos I, III e IV resulta na translocação de 10 prótons (as estimativas variam entre 9 e 12 prótons) para o espaço intermembrana. O retorno desses 10 prótons por meio da ATP-sintase promove a síntese de ~2,5 ATP.
- *FADH<sub>2</sub>* que se oxida no complexo II sem passar pelo Complexo I, transloca seis elétrons para o espaço intermembrana. O retorno desses 6 prótons por meio da ATP-sintase sintetiza ~1,5 ATP.

A *razão P/O* é uma medida do número de ATP sintetizados por átomo de oxigênio utilizado, ou por mol de água produzida. Estudos recentes confirmaram os valores (2,5 e 1,5) para a razão P/O e, portanto, não correspondem aos valores anteriormente usados (3 e 2, respectivamente). O transporte do fosfato para a matriz resulta em um ganho líquido de um próton. Desse modo, assumindo que 10 prótons são bombeados para fora da matriz mitocondrial e quatro prótons retornam para cada ATP sintetizado, 10/4 moléculas de ATP são produzidas para cada dois elétrons liberados do *NADH* para *O<sub>2</sub>* na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. Cálculo similar mostra que 6/4 moléculas de ATP são produzidas por elétrons emanados do *FADH<sub>2</sub>*.

## E. Regulação da fosforilação oxidativa

A velocidade do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa são controlados estritamente pelas necessidades energéticas da célula. O controle pelo ADP é ilustrado pelo fato que a mitocôndria só oxida o *NADH* e o *FADH<sub>2</sub>* quando houver disponibilidade de ADP e *P<sub>i</sub>* como substratos para a fosforilação. Os elétrons não fluem pela CMTE até o oxigênio, a menos que o ADP seja simultaneamente fosforilado a ATP. A velocidade da fosforilação oxidativa é limitada pelo quociente de ação das massas  $[ATP]/[ADP][P_i]$ . Ou seja, a ATP-sintase é inibida em altas concentrações de ATP e ativada quando as concentrações de ADP e *P<sub>i</sub>* estão elevadas. A ATP-sintase é inibida por altas concentrações de ATP e ativada por teores de ADP e *P<sub>i</sub>* elevados. As quantidades relativas de ATP e ADP intramitocondrial são controladas por duas proteínas transportadoras presentes na membrana interna: o translocador de ADP-ATP e o carreador de fosfato (*ver acima*).

O *translocador de ADP-ATP* é uma proteína dimérica responsável pela troca 1:1 do ATP intramitocondrial pelo ADP citoplasmático. Como o ATP possui uma carga negativa a mais que o ADP, o transporte do ATP para o exterior e do ADP para o interior da mitocôndria são favorecidas. O transporte de *H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>* junto com um próton é mediada pela fosfato-translocase, também conhecida como *H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup>* simporte (movem solutos através da membrana na mesma direção). O transporte de 4 prótons para o interior é necessário para a síntese de cada molécula de ATP; 3 para dirigir o rotor ATP-sintase e 1 para dirigir o transporte do fosfato para o interior.

## F. Desacopladores da fosforilação oxidativa

Os desacopladores da fosforilação oxidativa são substâncias presentes na membrana mitocondrial interna que dissipam o gradiente

de prótons ao trazerem novamente os prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, contornando a ATP-sintase. Aumentam a permeabilidade dos  $H^+$  e são capazes de dissociar a fosforilação oxidativa do transporte de elétrons.

**Quadro 8.1** – Alguns inibidores que interferem com a fosforilação oxidativa.

Sítio de inibição	Agente
Transporte de elétrons	Rotenona
	Amital
	Antimicina A
	Monóxido de carbono (CO)
	Cianeto
	Azida sódica
	Piercidina A
Membrana interna	2,4-dinitrofenol (DNP)
	Valinomicina
ATP-sintase	Oligomicina
	Venturicidina
	Proteína desacopladora (termogenina)

### G. Desacoplamento do transporte de elétrons e termogênese

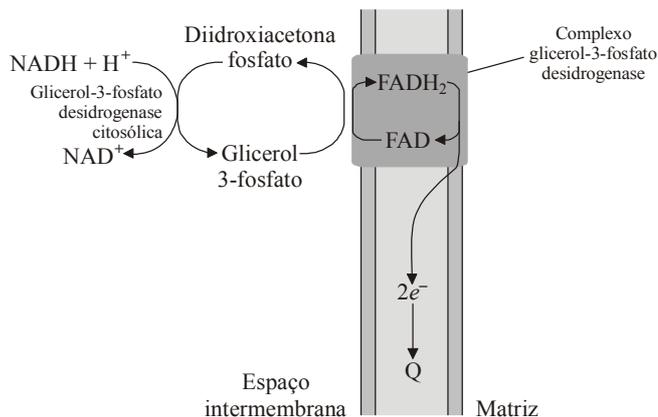
Recém-nascidos, animais que hibernam e animais adaptados ao frio necessitam maior produção de energia que a normalmente produzida pelo metabolismo. Os animais de sangue quente usam o calor para manter a temperatura do corpo. Sob condições normais, o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão intimamente acoplados de tal forma que o calor produzido é mantido ao mínimo. No *tecido adiposo marrom*, a maior parte da energia produzida pela CMTE não é empregada para formar ATP. Em lugar disso, ela é dissipada como calor. (Esse tecido tem cor marrom devido ao grande número de mitocôndrias que contêm). Ao redor de 10% da proteína na membrana mitocondrial interna é constituída de *termogenina* ou *proteína desacopladora* que permite que os prótons retornem à matriz sem passar pelo complexo  $F_0F_1$ . Desse modo, quando a termogenina está ativa, a energia de oxidação não é conservada na forma de ATP mas é dissipada como calor. A proteína desacopladora é ativada quando ela se liga a ácidos graxos.

O processo de geração de calor na gordura marrom, chamado *termogênese sem tremor*, é regulado pela noradrenalina (na termogênese com tremor, o calor é produzido pela contração muscular involuntária). A noradrenalina, um neurotransmissor liberado por neurônios especializados que terminam no tecido adiposo marrom, inicia um mecanismo de cascata que hidroliza moléculas de gordura. Os ácidos graxos produzidos por hidrólise das gorduras ativam a proteína desacopladora. A oxidação de ácidos graxos continua até cessar o sinal de noradrenalina ou até que as reservas de gorduras acabem.

## H. Transporte de elétrons do citosol para a mitocôndria

O NADH produzido na glicólise (na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato), não pode ser utilizado diretamente pela cadeia mitocondrial transportadora de elétrons para a formação de ATP. Como a geração de NADH (equivalente reduzido) ocorre no citosol e a membrana mitocondrial interna é impermeável a essa substância, é possível transportar somente os elétrons do NADH para a mitocôndria por um dos sistemas de circuitos, tais como, *circuito do glicerol-fosfato* e o *circuito do malato-aspartato*.

**1. Lançadeira do glicerol-fosfato.** Está presente nos músculos e cérebro dos mamíferos, e emprega a enzima *3-fosfoglicerol-desidrogenase* que catalisa a redução da diidroxiacetona fosfato pelo NADH para originar *3-fosfoglicerol*. O 3-fosfoglicerol difunde-se até a face externa da membrana mitocondrial interna onde localiza-se uma outra *3-fosfoglicerol-desidrogenase* que contém FAD. A diidroxiacetona fosfato é regenerada a partir da 3-fosfoglicerol formando FADH<sub>2</sub>. O FADH<sub>2</sub> entrega seus elétrons à coenzima Q para seguir a seqüência da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. Para cada NADH citosólico oxidado resulta apenas 1,5 ATP. A diidroxiacetona-fosfato é, então, transferida de volta para o citosol.

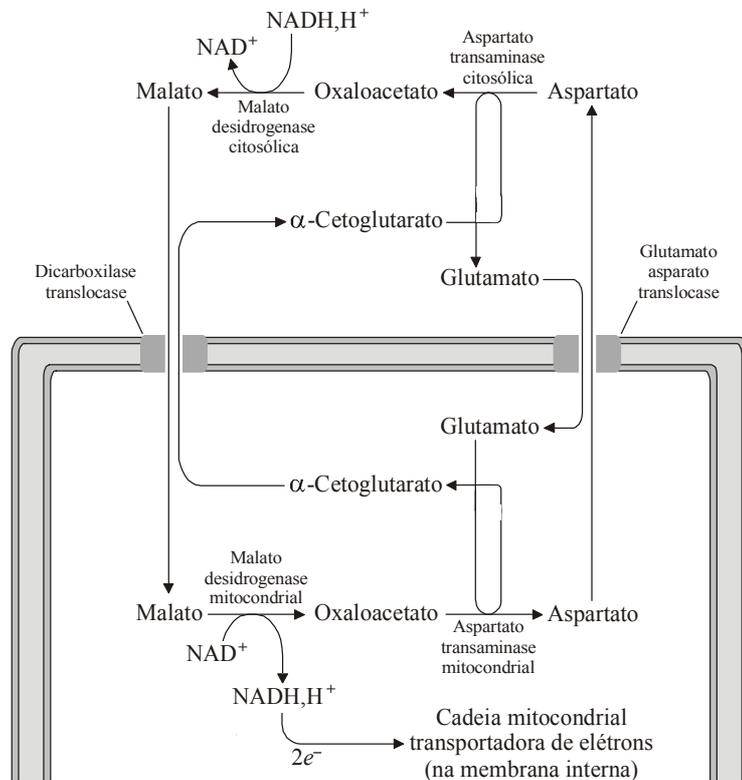


**Figura 8.12**

Circuito (lançadeira) glicerol-fosfato. O NADH citosólico reduz a diidroxiacetona-fosfato a glicerol-3-fosfato em reação catalisada pela glicerol-3-fosfato-desidrogenase citosólica. A reação reversa emprega uma flavoproteína ligada à superfície externa da membrana interna que transfere os elétrons para a coenzima Q (ubiquinona).

**2. Lançadeira do malato-aspartato.** Está disponível nas células hepáticas, cardíacas e renais e de outros tecidos. Nesse sistema, o NADH citosólico reduz o oxaloacetato a malato pela *malato-desidrogenase* extramitocondrial. O malato transpõe a membrana mitocondrial interna onde é reoxidado a oxaloacetato pela malato desidrogenase mitocondrial que utiliza o NAD<sup>+</sup> como coenzima. Pela reoxidação do malato na matriz, ocorre a transferência dos equivalentes reduzidos provenientes do citosol. O oxaloacetato formado é transformado em aspartato que pode atravessar a membrana. Este sai da mitocôndria e, no citosol, regenera o

oxaloacetato. O NADH regenerado na mitocôndria transfere os elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, onde forma ATP.



**Figura 8.13**

Circuito do malato-aspartato. O NADH citosólico reduz o oxaloacetato a malato., que é transportado através da membrana interna para a matriz mitocondrial. A reoxidação do malato gera NADH que transfere os elétrons para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons.

A operação contínua do circuito necessita o retorno do oxaloacetato para o citosol. O oxaloacetato citosólico é regenerado por meio de reações de transaminação tanto mitocondriais como citosólicas.

Todos os tecidos que possuem mitocôndria, parecem ter a carreadores que atravessam a membrana. A proporção de cada *lançadeira* varia para cada tecido. O fígado utiliza, principalmente, a malato-aspartato, enquanto certas células musculares são mais dependentes do circuito do glicerol-fosfato.

## 8.5 Rendimento da oxidação completa da glicose

Cada molécula de glicose completamente oxidada a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  pelas vias da glicólise, ciclo do ácido cítrico e cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, utilizando o circuito malato/aspartato (*ver* Capítulo 6: Metabolismo dos carboidratos) gera 32 moléculas de ATP (Tabela 8.3) aceitando os novos valores para a relação P/O (*ver*

acima). Os valores anteriormente usados para o rendimento de ATP pela oxidação completa da glicose é 38 ATP.

**Tabela 8.3** – Balanço de ATP formados pela completa oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> na glicólise e no ciclo do ácido cítrico

Reações	ATP/mol
Fosforilação da glicose	-1
Fosforilação da glicose 6-fosfato	-1
2 (desfosforilação do 1,3-bifosfoglicerato)	+2
2 (desfosforilação do fosfoenolpiruvato)	+2
2 x 1 NADH (oxidação do gliceraldeído 3-fosfato)	+5
2 x 1 NADH (descarboxilação oxidativa do piruvato)	+5
2 x 3 NADH (ciclo do ácido cítrico)	+15
2 x 1 FADH <sub>2</sub> (ciclo do ácido cítrico)	+3
2 x 1 GTP (ciclo do ácido cítrico)	+2
Total	+31

A utilização do circuito glicerol-fosfato encontrada no músculo esquelético e no cérebro, apenas 30ATP são formados.

A oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, libera -2870 kJ·mol<sup>-1</sup>. A energia livre padrão necessária para sintetizar 1 mol de ATP a partir de ADP e P<sub>i</sub> é 30,5 kJ·mol<sup>-1</sup>. A energia livre para a síntese de 32 ATP corresponde a 32 x 30,5 = -976 kJ·mol<sup>-1</sup>. A eficiência termodinâmica de formação de ATP a partir da glicose é 976 x 100/2870 = 34%. Assim, aproximadamente 34% da energia liberada na completa oxidação da glicose é conservada como ATP.

## 8.6 Estresse oxidativo

Algumas vezes, o oxigênio pode aceitar elétrons para formar derivados instáveis, conhecidos como *espécies reativas de oxigênio* (ROS) que incluem o *radical superóxido*, *peróxido de hidrogênio*, *radical hidroxila* e *singlet oxigen*. Como os ROS reagem facilmente com vários componentes celulares, a sua ação pode lesar células de modo significativo. Nos organismos vivos, a formação de ROS é geralmente mantida em quantidades mínimas por mecanismos antioxidantes. (Antioxidantes são substâncias que inibem a reação de moléculas com radicais oxigênio).

Em certas ocasiões, denominadas coletivamente como *estresse oxidativo*, os mecanismos antioxidantes são contornados com a ocorrência de lesão oxidativa. A lesão ocorre principalmente por inativação enzimática, despolimerização polissacarídica, lesões oxidativas no DNA e rompimento das membranas biológicas. Exemplos de circunstâncias que podem causar sérias lesões oxidativas incluem certas anormalidades metabólicas, o consumo exagerado de certos fármacos, a exposição a radiação intensa e contato repetitivo com certos contaminantes ambientais (exemplo, fumaça de cigarro).

Além da contribuição aos processos de envelhecimento, a lesão oxidativa foi relacionada a um grande número de doenças, entre as

quais estão câncer, desordens cardiovasculares (aterosclerose, infarto do miocárdio, hipertensão), desordens neurológicas como a esclerose amiotrófica lateral (ALS; doença de Lou Gehring), doença de Parkinson, doença de Alzheimer. Vários tipos de células deliberadamente produzem grandes quantidades de ROS. Por exemplo, os macrófagos e neutrófilos continuamente atuam buscando microrganismos e células lesionadas.

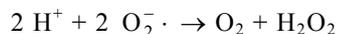
### A. Espécies reativas de oxigênio

As propriedades do oxigênio estão diretamente relacionadas com sua estrutura molecular. A molécula de oxigênio diatômica é um diradical. Um radical é um átomo ou grupo de átomos que contém um ou mais elétrons não-emparelhados. Dioxigênio é um diradical porque possui dois elétrons não-emparelhados. Por essa e outras razões, quando reage, o dioxigênio pode aceitar somente um elétron por vez.

Relembrando que na sequência da cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, a  $H_2O$  é formada como resultado da transferência sequencial de 4 elétrons para o  $O_2$ . Durante o processo, vários ROS são formados. A citocromo-oxidase captura os intermediários reativos em seu sítio ativo até que todos os 4 elétrons tenham sido transferidos para o oxigênio. Entretanto, os elétrons podem escapar da via de transporte de elétrons e reagir com o  $O_2$  para formar ROS.

Sob circunstâncias normais, os mecanismos antioxidantes de defesa celular minimizam as lesões. ROS também são formados durante processos não-enzimáticos. Por exemplo, a exposição à luz ultravioleta e a radiação ionizante causam a formação de ROS.

O primeiro ROS formado durante a oxidação do oxigênio é o radical superóxido ( $O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \cdot$ ). A maioria dos radicais superóxidos são produzidos na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons pelos elétrons derivados do ciclo Q no complexo III e pela flavina NADH-desidrogenase (complexo I). O radical superóxido atua como nucleófilo e (sob condições específicas) tanto como agente oxidante como agente redutor. Devido as suas propriedades de solubilidade, o  $O_2^- \cdot$  causa considerável lesões oxidativas aos componentes fosfolipídicos da membrana. Quando gerado em meio aquoso, o  $O_2^- \cdot$  reage consigo mesmo para formar  $O_2$  e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ):



O  $H_2O_2$  não é um radical pois não possui nenhum elétron desemparelhado. A limitada reatividade do  $H_2O_2$  permite a sua passagem através de membranas e torna-se grandemente disperso. A reação subsequente do  $H_2O_2$  com o  $Fe^{2+}$  (ou outro metal de transição) resulta na produção do radical hidroxila, uma espécie altamente reativa.

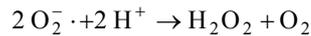


Radicais como o radical hidroxila são especialmente perigosos porque podem iniciar reações autocatalíticas.

## B. Mecanismos enzimáticos antioxidantes

As principais defesas enzimáticas contra o estresse oxidativo são: a superóxido-dismutase, a glutatona-peroxidase e a catalase. A ampla distribuição celular dessas enzimas previne a ação de espécies de oxigênio reativas.

**1. Superóxido-dismutase (SOD).** É uma classe de enzimas que cataliza a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  a partir do radical superóxido:



Existem duas formas principais de SOD. Em humanos ocorre no citoplasma a isoenzima Cu-Zn. Uma isoenzima contendo Mn é encontrada na matriz mitocondrial. A doença de Lou Gehring (esclerose amiotrófica lateral), uma condição degenerativa fatal na qual ocorre a degeneração neuromotora, é causada por mutação no gene que codifica a isoenzima Cu-Zn citosólica da SOD.

**2. Glutatona-peroxidase.** É uma enzima chave no sistema responsável pelo controle dos níveis de peroxidase celular. A enzima contém selênio e a enzima catalisa a redução de várias substâncias pelo agente redutor glutatona (GSH). Além da redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar água, a glutatona-peroxidase transforma peróxidos orgânicos em álcoois:

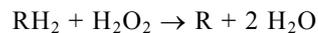


Várias enzimas auxiliares mantêm a função da glutatona-peroxidase. A GSH é regenerada a partir do GSSG (glutatona-dissulfeto) pela glutatona-redutase:



O NADPH necessário para a reação é fornecido principalmente pela via das pentoses-fosfato (*ver* Capítulo 6: Metabolismo dos carboidratos). O NADPH também é produzido por reações catalisadas pela isocitrato-desidrogenase e pela enzima málica.

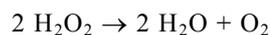
**3. Catalase.** É uma enzima contendo heme que emprega o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para oxidar outros substratos:



Quantidades abundantes de catalase são encontradas nos peroxissomos, ricos em  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerados em várias reações:



O excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é convertido em água pela catalase:



## C. Moléculas antioxidantes

Os organismos vivos usam moléculas antioxidantes para se autoprotger dos radicais. Alguns dos mais proeminentes incluem a glutatona (GSH), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e o  $\beta$ -caroteno.

## Resumo

1. A maioria das reações que captam ou liberam energia são reações de oxidação-redução. Nessas reações, os elétrons são transferidos entre o doador de elétrons (agente redutor) e o receptor de elétrons (agente oxidante). Em algumas reações, somente os elétrons são transferidos; em outras, tanto os elétrons como os prótons são transferidos. A tendência de um par redox conjugado em perder um elétron é chamado potencial redox. Os elétrons fluem espontaneamente do par redox eletronegativo para o mais positivo. Nas reações redox favoráveis o  $\Delta E^{\circ}$  é positivo e  $\Delta G^{\circ}$  é negativo.
2. O oxigênio é empregado pelos organismos aeróbicos como receptor terminal de elétrons na geração de energia. Várias propriedades físicas e químicas o tornam capaz desse papel. Além de sua disponibilidade, o oxigênio difunde facilmente através das membranas celulares e facilmente aceita elétrons.
3. As moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub> produzidas na glicólise,  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, oxidação de alguns aminoácidos e ciclo do ácido cítrico geram energia na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons. A via consiste de uma série de carreadores redox que recebem elétrons do NADH e FADH<sub>2</sub>. No final do caminho os elétrons, juntamente com os prótons são doados para o oxigênio para formar H<sub>2</sub>O.
4. Durante a oxidação de NADH, existem três etapas na quais a energia liberada é suficiente para sintetizar ATP. São elas: as etapas I, III e IV.
5. A fosforilação oxidativa é o mecanismo no qual o transporte de elétrons está acoplado para a síntese de ATP. De acordo com a teoria quimiosmótica, a criação de um gradiente de prótons que acompanha o transporte de elétrons está acoplado a síntese de ATP.
6. A completa oxidação de uma molécula de glicose resulta na síntese de 29,5 a 31 ATP, dependendo do circuito (lançadeira) de elétrons utilizado, o circuito glicerol-fosfato ou o circuito malato-aspartato, para transferir os elétrons do NADH citoplasmático para a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons.
7. O uso de oxigênio pelos organismos aeróbicos relaciona-se com a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). O ROS é formado porque as moléculas de diradical de oxigênio aceita um elétron por vez. Exemplos de ROS incluem o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e *singlet oxygen*. O risco da presença de elevado conteúdo de ROS é mantido ao mínimo por mecanismos celulares de defesa antioxidante.

## Referências

McKEE, T., McKEE, J.R. **Biochemistry**: The molecular basis of life. 3 ed. Boston: McGraw-Hill, 2003. p. 298-330.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger**: Princípios de bioquímica. 3 ed. São Paulo : Sarvier, 2002. p. 515-62.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 1996. p. 502-28.

VOET, D., VOET, J.G., PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre : Artmed, 2000. p. 492-528.