

UNIDADE VII

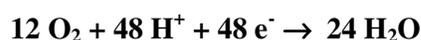
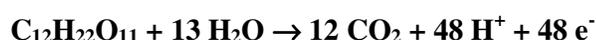
RESPIRAÇÃO

RESPIRAÇÃO

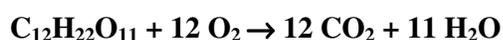
1 – INTRODUÇÃO

A respiração aeróbica é comum em todos os organismos eucariotos, sendo que a respiração nas plantas apresenta algumas diferenças em relação à respiração de animais. A respiração é um processo biológico no qual compostos orgânicos reduzidos são mobilizados e subsequentemente oxidados de maneira controlada. Durante a respiração, energia livre é liberada e parte é incorporada em forma de ATP, uma fonte de energia que pode ser prontamente utilizada na manutenção e no crescimento da planta. A equação geral da respiração é inversa à da fotossíntese.

Do ponto de vista químico, a respiração vegetal pode ser expressa como a oxidação da molécula de 12 carbonos da sacarose e a redução de 12 moléculas de H₂O:



Resultando na seguinte reação líquida:



$$\Delta G' = - 1.380 \text{ kcal/mol ou } - 5.760 \text{ kJ/mol}$$

(1 caloria = 4,1865 joules)

Neste caso, sacarose é oxidada até CO₂ e O₂ é reduzido para água. Parte da energia livre, liberada por esta reação, é utilizada para síntese de ATP, a função primária da respiração. Além disso, muitos intermediários envolvidos nas reações da respiração são utilizados como fontes de carbono para a síntese de muitos outros compostos de planta (por exemplo, aminoácidos).

É importante destacar, que a energia proveniente da oxidação de sacarose não é liberada de uma única vez. Para evitar danos na estrutura da célula, a energia resultante da oxidação de sacarose, é liberada passo a passo, mediante uma série de reações em sequência. Estas reações podem ser divididas em três fases: a Glicólise, o Ciclo do Ácido Tricarboxílico (Ciclo de Krebs) e a Cadeia de Transporte de Elétrons.

2 – A RESPIRAÇÃO CELULAR

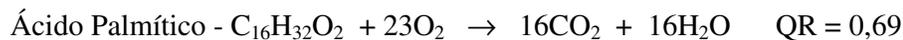
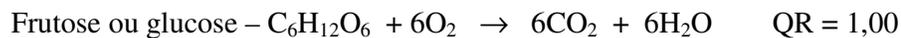
a) Os Substratos da Respiração

Embora a glucose seja geralmente aceita como o substrato da respiração, o carbono, na realidade, é derivado de diversas fontes: sacarose (principal em plantas), polímeros de glucose (amido), polímeros contendo frutose (frutanas) e outros açúcares, lipídios (triacilgliceróis), ácidos orgânicos e, ocasionalmente proteínas (**a degradação das macromoléculas será estudada na Unidade XIII, Dormência e Germinação**).

O tipo de substrato que está sendo respirado pode ser indicado, medindo-se as quantidades relativas de CO₂ liberado e O₂ consumido. Isto permite calcular o quociente respiratório (QR), que é dado pela seguinte fórmula:

$$QR = \frac{\text{Moles de CO}_2 \text{ liberado}}{\text{Moles de O}_2 \text{ consumido}}$$

O valor do QR é função do estado de oxidação do substrato. Note que, quando carboidrato está sendo respirado (ver equação geral da respiração) o valor teórico de QR é igual a um (6 CO₂/6 O₂). Experimentalmente, os valores obtidos variam de 0,97 a 1,17. Como os lipídios e proteínas se apresentam em um estado mais reduzido que os carboidratos, mais O₂ é requerido para sua completa oxidação e os valores de QR ficam em torno de 0,7. Por outro lado, os ácidos orgânicos, como citrato e malato, são mais oxidados que os carboidratos, e os valores de QR ficam em torno de 1,3. Veja os exemplos abaixo:



Embora o valor do QR seja útil em alguns casos, deve-se ter cuidado quando da sua interpretação. Por exemplo, é possível que mais de um substrato esteja sendo respirado ao mesmo tempo e, neste caso, o QR representa um valor médio. Além disso, quando a célula está realizando a fermentação nenhum O₂ é consumido e o valor do QR torna-se bastante elevado.

Finalmente, é importante destacar que os principais substratos da respiração são os carboidratos. Assim, valor de QR em torno de 1,0 parece ser o mais comum. Valores de QR menores que 1,0 podem indicar deficiência de carboidratos (fome), sendo associados ao consumo de proteínas.

b) Glicólise

A glicólise ocorre em todos os organismos vivos e, evolucionariamente, é o mais velho dos três estágios da respiração. As enzimas que catalisam as reações da glicólise estão localizadas no citosol, e em plantas, também nos plastídios, e nenhum oxigênio é requerido para converter sacarose a piruvato. Isso sugere que a glicólise deve ter sido, provavelmente, o processo fornecedor de energia nas células primitivas, que realizavam a respiração anaeróbica, antes do aparecimento do O₂ na atmosfera e da fotossíntese.

Na glicólise (glico = açúcar; lise = quebra) de plantas, uma molécula de sacarose (um açúcar de 12 carbonos) é quebrada e produz quatro moléculas de açúcar de três carbonos (trioses). Estas trioses são, então, oxidadas e re-arranjadas para produzir quatro moléculas de piruvato.

Os carboidratos estocados na forma de amido, frutanas ou sacarose devem ser, portanto, hidrolisados para liberar os monossacarídeos (glucose e frutose).

A degradação do amido pode ocorrer através de duas vias: uma hidrolítica e outra fosforolítica (Figura 1). Na degradação **Hidrolítica**, o amido é degradado liberando glucose, mediante a ação de quatro enzimas: α -amilase, β -amilase, Enzima desramificadora e a α -1,4-glucosidase. Na via **Fosforolítica** o amido é degradado liberando glucose 1-fosfato, pela ação da enzima fosforilase do amido (Figura 1).

É importante destacar que o amido é armazenado e degradado dentro dos plastídios, porém, a etapa inicial da respiração, ou seja, a glicólise, ocorre no citosol. Assim, o produto da degradação do amido deve atravessar a membrana do plastídio, por meio de carreadores específicos, para ter acesso à maquinaria respiratória. A glucose, produto da degradação

hidrolítica, pode deixar o plastídio através de um transportador de hexoses. A glucose-1-fosfato, o produto da via fosforolítica, é primeiro convertido para triose-fosfato (gliceraldeído-3-fosfato), a qual deixa o plastídio através de um transportador que troca uma triose-fosfato (para o citosol) por um fosfato inorgânico (entra no plastídio)

A sacarose, principal substrato para a respiração vegetal, é degradada por ação de duas enzimas: sintase da sacarose e a invertase (invertase alcalina e a invertase ácida). A sintase da sacarose e a invertase alcalina são localizadas principalmente no citosol, enquanto a invertase ácida é encontrada associada às paredes celulares e aos vacúolos (locais em que o pH fica próximo de 5,0). As equações catalisadas são:



A importância destas enzimas depende do local onde a sacarose está sendo metabolizada. Algumas evidências indicam que a sintase da sacarose é a principal enzima que degrada sacarose em órgãos que estocam amido (semente em desenvolvimento, tubérculos) e em tecidos em rápido crescimento, os quais precisam utilizar a sacarose translocada no processo de respiração (produção de energia e de esqueletos de carbono). No entanto, quando o descarregamento do floema ocorre via apoplasto, a invertase ácida presente na parede celular pode converter a sacarose em hexoses (frutose e glucose) antes que elas entrem na célula. No caso de células maduras, a invertase citosólica pode ter importância na degradação de sacarose, fornecendo glucose e frutose para a respiração.

Na via glicolítica, os monossacarídeos gerados são primeiramente convertidos para Frutose-1,6-bisfosfato, com gasto de energia na forma de ATP (Figura 1). Em geral, são consumidos 2 ATP/molécula de hexose (glucose ou frutose), que entra nesta etapa da glicólise (Figura 1, reações 1 ou 3 e 4). No entanto, apenas um ATP é requerido quando o amido é degradado pela via fosforolítica. Isto ocorre porque o produto da via fosforolítica é glucose-1-fosfato.

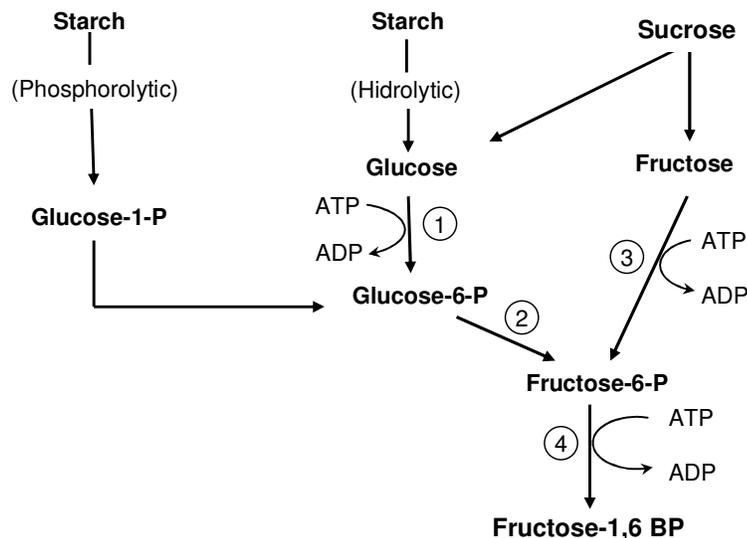


Figura 1 – Primeira etapa da glicólise, produzindo 2 Frutose-1,6-bisfosfato a partir de sacarose. Enzimas: (1) hexoquinase, (2) isomerase da hexosefosfato, (3) frutoquinase e (4) fosfofrutoquinase (Hopkins, 2000).

OBS: Células de plantas possuem uma Fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato, que, ao contrário da Fosfofrutoquinase dependente de ATP, permite que a reação 4 (Figura 1) seja reversível. Isto pode ser importante na conversão de lipídios em glicose (gluconeogênese).

Na etapa seguinte da glicólise, a frutose-1,6-bisfosfato é inicialmente clivada e produz duas moléculas de três carbonos, Dihidroxiacetona-fosfato e Gliceraldeído-3-fosfato (Figura 2). A molécula de dihidroxiacetona-fosfato é prontamente convertida para gliceraldeído-3-fosfato e vice-versa. Isto indica que uma molécula de frutose-1,6-bisfosfato (6 C) poderá produzir duas moléculas de piruvato (3 C), considerando que as moléculas de dihidroxiacetona-fosfato são convertidas para gliceraldeído-3-fosfato, que continuam no ciclo.

Uma importante função da glicólise é a produção de energia, que pode ocorrer de duas maneiras. A primeira é a formação de poder redutor na forma de NADH. Na reação 3 (Figura 2), duas moléculas de NADH são produzidas quando gliceraldeído-3-P é oxidado para 1,3-bisfosfoglicerato. Esta oxidação parcial não requer O_2 e também não resulta na liberação de CO_2 . O NADH gerado pode ser usado como poder redutor para a síntese de outras moléculas (principalmente na fermentação) ou, na presença de oxigênio, pode ser metabolizado na mitocôndria para produzir ATP (respiração aeróbica).

- (P) = phosphate group = $-PO_3H^-$

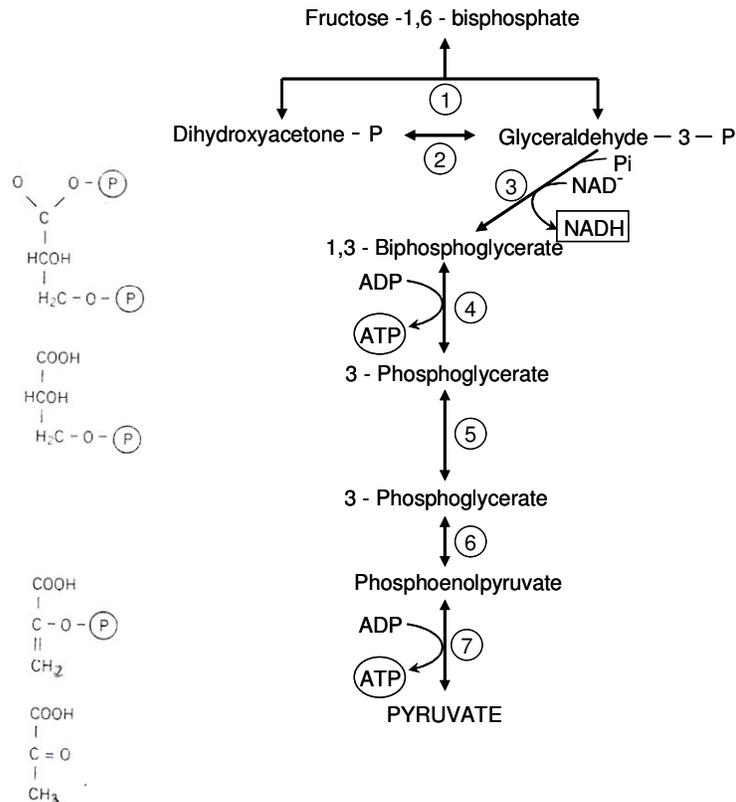
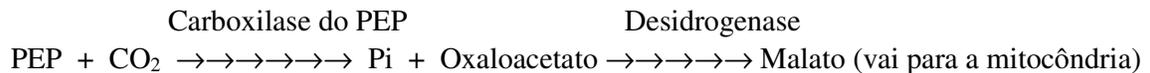


Figura 2 – A segunda etapa da glicólise, convertendo 2 Frutose-1,6-bisfosfato em 4 piruvato a partir de sacarose. Enzimas: (1) aldolase, (2) isomerase da triosefosfato, (3) desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato, (4) Quinase do fosfoglicerato, (5) mutase do fosfoglicerato, (6) enolase e (7) quinase do piruvato (Hopkins, 2000).

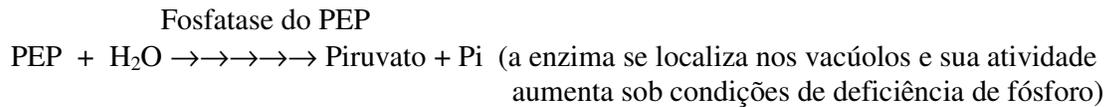
A energia contida nas moléculas de hexoses é também conservada na forma de ATP, nas reações 4 e 7 (Figura 2). A formação de ATP ocorre em um tipo de reação referida como FOSFORILAÇÃO AO NÍVEL DO SUBSTRATO, por que envolve a transferência direta de um grupo fosfato da molécula substrato para o ADP. Os compostos 1,3-bisfosfoglicerato e fosfoenolpiruvato armazenam energia livre suficiente para gerar uma molécula de ATP. Em geral, para cada molécula de sacarose que entra na glicólise, 8 ATP são formados (dois para cada triose). Como na fase inicial da glicólise ocorre o gasto de 4 ATP, o SALDO é de 4 ATP para cada molécula de sacarose convertida para quatro moléculas de piruvato.

OBS: No final da glicólise, em adição à Quinase do Piruvato, as plantas apresentam duas vias alternativas para o metabolismo do fosfoenolpiruvato (PEP):



OBS 1: Estas reações são chamadas de Anapleróticas ou de Suplementação (ver item g)

OBS 2: Pi (fosfato inorgânico)



O destino do piruvato formado na glicólise depende das condições em que as células ou o organismo estão crescendo. Sob condições aeróbicas, o piruvato passa do citosol para a mitocôndria onde é completamente oxidado até CO_2 e H_2O (Figura 3).

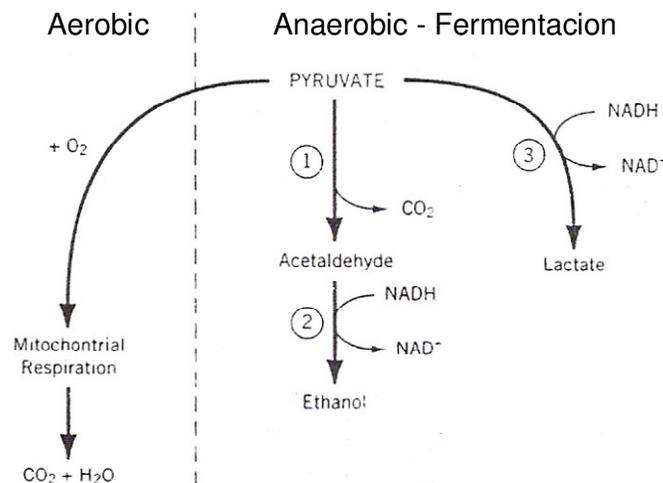


Figura 3 – O destino do piruvato produzido pela glicólise. Enzimas: (1) descarboxilase do piruvato, (2) desidrogenase alcoólica, (3) desidrogenase do lactato (Hopkins, 2000).

É importante destacar que embora as plantas superiores sejam organismos aeróbicos obrigatórios, seus tecidos ou órgãos podem, ocasionalmente, estar sujeitos a condições anaeróbicas. Situações típicas ocorrem quando as suas raízes estão submetidas a condições de solo alagado com água, no início do processo germinativo de sementes grandes, na

mobilização e sob condições de estresse hídrico e salino. Nestes casos, ocorre uma mudança no metabolismo e o processo respiratório predominante é a **fermentação** (Figura 3). Nas plantas predomina a **fermentação alcoólica**, em que as enzimas descarboxilase do piruvato e desidrogenase alcoólica convertem o piruvato em etanol e CO_2 e o NADH (produzido na reação 3 da Figura 2) é oxidado, regenerando o NAD^+ . Na **fermentação láctica** (comum em animais e também presente nas plantas), a enzima desidrogenase do lactato usa o NADH para reduzir piruvato a lactato, regenerando o NAD^+ . Acredita-se que o etanol é um produto menos tóxico do que o lactato, pois o acúmulo deste último promove acidificação do citosol.

OBS: Note que as reações da fermentação (láctica ou alcoólica) regeneram o NAD^+ .

c) Ciclo do Ácido Tricarboxílico (Krebs)

A quebra de uma molécula de sacarose produzindo quatro moléculas de piruvato libera menos de 25% da energia total da sacarose. A energia restante permanece estocada nas quatro moléculas de piruvato. Os dois próximos estágios da respiração (ciclo de Krebs e CTE) que completam a oxidação da sacarose ocorrem em uma organela circundada por uma dupla membrana, a **mitocôndria**.

As mitocôndrias possuem duas membranas: uma externa (sem invaginação) e outra interna que se apresenta completamente invaginada, formando as conhecidas cristas mitocondriais (Figura 4). A fase aquosa contida dentro da membrana interna é conhecida como matriz e a região entre as duas membranas é conhecida como espaço intermembranar. Estes compartimentos possuem composições diferentes, o que se deve aos diferentes graus de permeabilidade das membranas externa e interna. A membrana externa permite a passagem de íons e moléculas com tamanho abaixo de 10.000 Da. A membrana interna restringe a entrada de íons e pequenas moléculas e possui carreadores específicos que promovem a troca de íons e de moléculas entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranar.

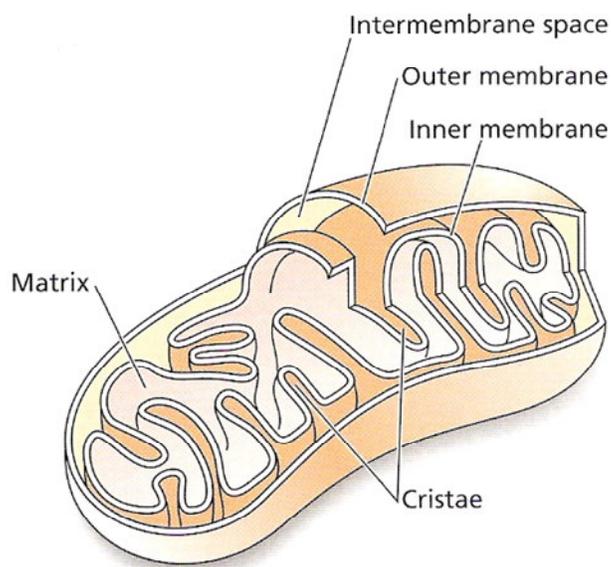


Figura 4 – Um diagrama mostrando os diferentes compartimentos da mitocôndria (Taiz & Zeiger, 1998).

Para que o piruvato formado na glicólise (citólise) seja utilizado na respiração aeróbica é necessário, portanto, que ele seja transportado para a matriz mitocondrial. Isto ocorre através de um translocador localizado na membrana interna da mitocôndria, o qual catalisa uma troca eletroneutra de piruvato por OH⁻. Na matriz mitocondrial, o piruvato é oxidativamente descarboxilado pela enzima desidrogenase do piruvato e produz NADH, CO₂ e acetil-CoA. O acetil-CoA é combinado com um ácido de 4 carbonos (Oxaloacetato), reação catalisada pela sintase do citrato, produzindo um ácido tricarbóxico de 6 carbonos (ácido cítrico). Esta reação inicia a série de reações conhecida como **ciclo do ácido cítrico** ou **ciclo do ácido tricarbóxico** ou **ciclo de Krebs** (Figura 5). Este ciclo de reações representa o segundo estágio da respiração e ocorre na matriz mitocondrial.

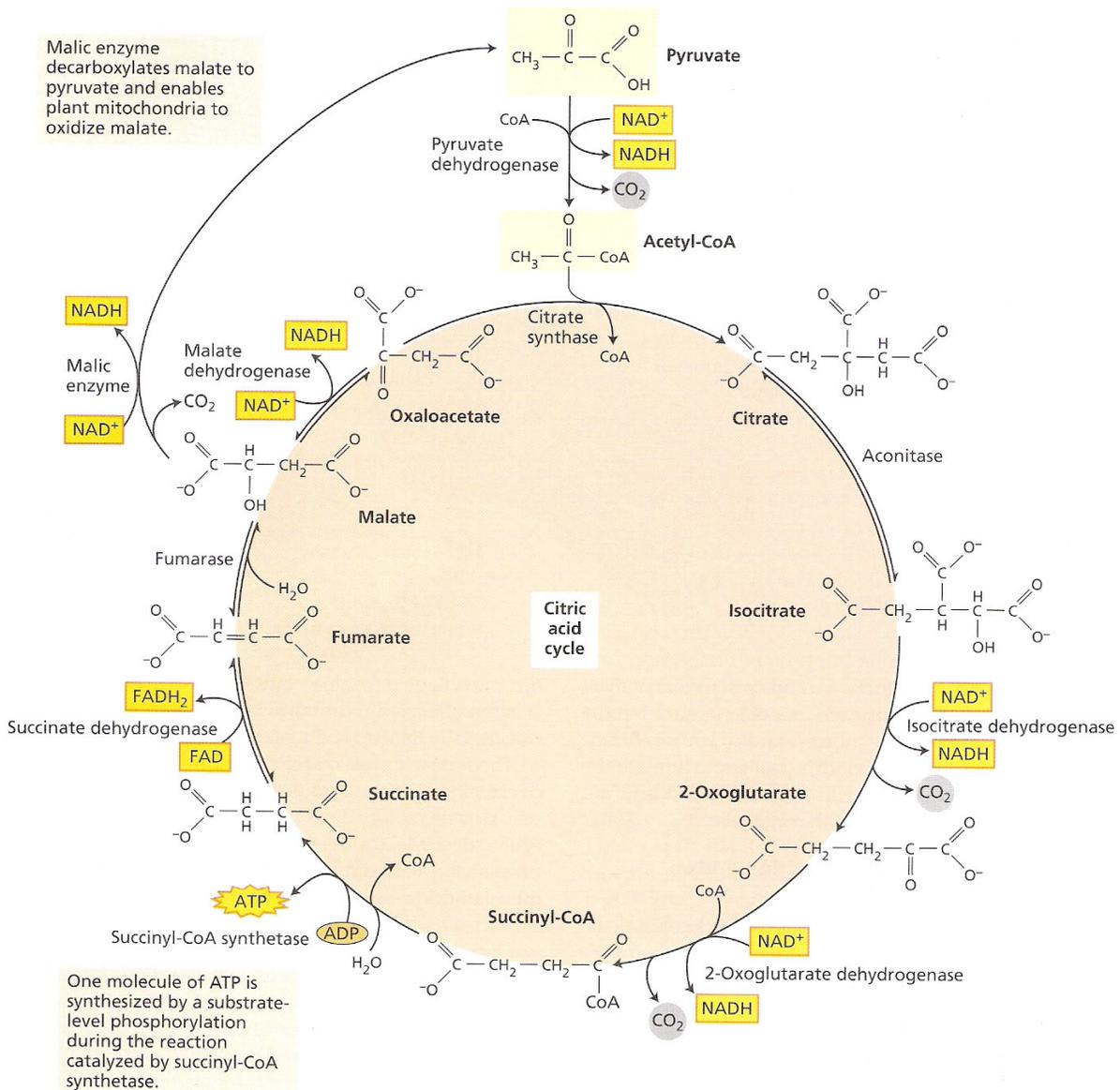
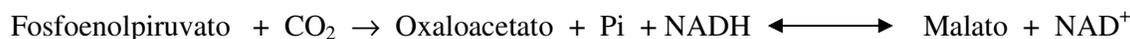


Figura 5 – As reações do ciclo do ácido cítrico (Taiz & Zeiger, 1998)

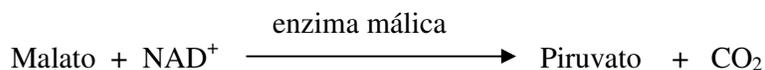
O ciclo de Krebs mostrado anteriormente apresenta algumas diferenças entre a respiração dos vegetais e a dos animais. Por exemplo, na etapa em que o composto Succinil-CoA é convertido para Succinato, ocorre produção de ATP em plantas (Figura 5), enquanto que nos animais ocorre inicialmente a produção de GTP.

Outra feição característica do ciclo de Krebs de plantas é a atividade da enzima málica dependente de NAD^+ . A atividade desta enzima permite a completa oxidação de ácidos orgânicos, na ausência do substrato normal do ciclo, o piruvato. Por exemplo, o fosfoenolpiruvato no citosol pode ser convertido para oxaloacetato e fosfato inorgânico (Pi) por ação da carboxilase do PEP. Ainda no citosol, a desidrogenase do malato converte oxaloacetato em malato, consumindo NADH (**As reações mostradas abaixo são chamadas de Reações Anapleróticas**). O malato é transportado para a matriz mitocondrial através de um translocador de dicarboxilatos, na membrana interna da mitocôndria. Na mitocôndria, por ação da enzima málica dependente de NAD^+ (presente nas plantas), o malato é convertido para piruvato, o qual pode ser oxidado no ciclo de Krebs (ver reações abaixo).

No citosol:



Na Mitocôndria:



Em resumo, o ciclo de Krebs consiste de oito etapas catalisadas por enzimas, começando com a condensação do acetil-CoA (2C) com o oxaloacetato (4C) para formar o ácido cítrico (6C). Os carbonos derivados do acetil-CoA são liberados na forma de CO_2 . O ciclo inclui ainda quatro reações de oxidação, as quais produzem três moléculas de NADH e uma de FADH_2 (por molécula de piruvato). Uma molécula de ATP é formada pela fosforilação ao nível do substrato. Finalmente, o oxaloacetato é regenerado, permitindo a continuação do ciclo.

As funções do ciclo de Krebs são:

- Redução de NAD^+ e FAD, produzindo as formas doadoras de elétrons NADH e FADH_2 , as quais são posteriormente oxidadas na CTE para formação de ATP;
- Síntese de ATP pela fosforilação ao nível do substrato (produz um ATP por molécula de piruvato);
- Formação de esqueletos de carbono que podem ser utilizados para a síntese de muitos compostos da planta. Por exemplo, o α -cetogluturato é usado para síntese de glutamato, o qual produz alguns outros aminoácidos (família do glutamato); o oxaloacetato é usado na síntese de aspartato, o qual dá origem a outros aminoácidos (família do aspartato).

d) Cadeia de Transporte de Elétrons

Visto que a fosforilação é a forma de energia usada pelas células para realizar os processos biológicos, os elétrons ricos em energia capturados na glicólise (NADH) e no ciclo de Krebs (na forma de NADH e FADH_2) devem ser convertidos para ATP. Este processo dependente de O_2 ocorre na parte interna da membrana interna da mitocôndria e envolve uma série de carreadores de elétrons, conhecida como **cadeia de transporte de elétrons (CTE)**.

Para cada molécula de sacarose oxidada, quatro moléculas de NADH são geradas no citosol (glicólise) e 16 moléculas de NADH^+ e quatro moléculas de FADH_2 são geradas na

mitocôndria (ciclo de Krebs). A CTE catalisa o fluxo de elétrons do NADH e FADH₂ para o oxigênio, o aceptor final de elétrons da respiração, regenerando o NAD⁺ e FAD⁺.



O papel da CTE é a oxidação de NADH e FADH₂ e, no processo, utiliza-se parte da energia liberada para gerar gradiente eletroquímico de H⁺ através da membrana interna da mitocôndria, o qual é utilizado para sintetizar ATP.

As proteínas transportadoras de elétrons são organizadas em quatro complexos multi-protéicos, localizados na membrana interna da mitocôndria (Figura 6):

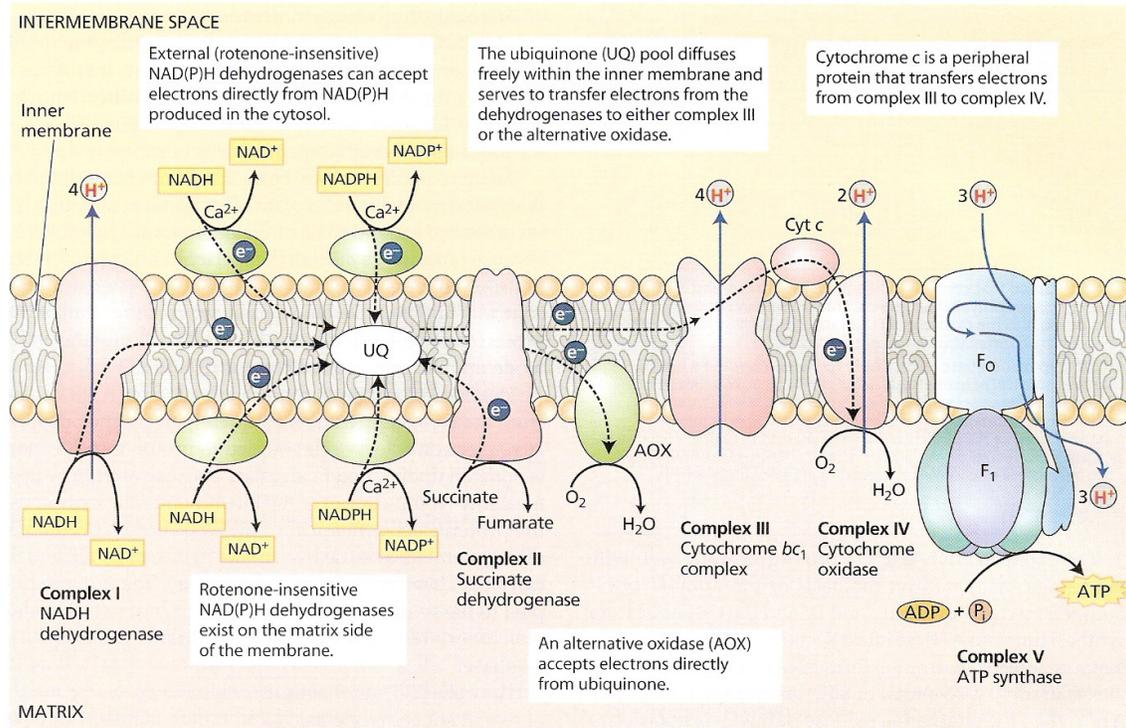


Figura 6 – A organização da cadeia de transporte de elétrons de mitocôndrias de plantas (Taiz & Zeiger, 1998).

- **Complexo I: Desidrogenase do NADH (NADH:ubiquinona óxido - redutase)** – Este complexo recebe elétrons do NADH e transfere-os, via cofatores específicos (flavina mono nucleotídeo – FMN e proteínas Fe-S), para uma molécula de **ubiquinona (Q)**. Esta molécula de ubiquinona move-se dentro da membrana interna, não estando associada a nenhum complexo protéico. A atividade deste complexo é inibida pela Rotenona.
- **Complexo II: Desidrogenase do succinato (Succinato: ubiquinona óxido - redutase)** – Este complexo é composto pela desidrogenase do succinato. Os elétrons derivados da oxidação do succinato são transferidos, via FADH₂ e um grupo de proteínas Fe-S, também para moléculas de ubiquinona. Este complexo é competitivamente inibido pelo malonato.

Como se vê, as atividades dos complexos I e II produzem um “pool” de ubiquinol (QH₂), que transferirá os elétrons para o complexo III.

- Complexo III: Complexo do Citocromo bc_1 (Ubiquinol:citocromo c óxido - redutase) – Este complexo oxida ubiquinol e transfere os elétrons via uma centro Fe-S, dois citocromos b e um citocromo c_1 ligado à membrana, para o **citocromo c**. O citocromo c é uma proteína da CTE que não é integral, e serve como um carreador móvel que transfere os elétrons do Complexo III para o Complexo IV.
- Complexo IV (oxidase do citocromo c) – Este complexo oxida o citocromo c e reduz o O_2 para H_2O . Ele contém duas proteínas contendo dois átomos de cobre e os citocromos a e a_3 . O complexo IV transfere 4 elétrons para o O_2 , formando duas moléculas de H_2O . Este complexo é fortemente inibido por cianeto, monóxido de carbono (CO) e azida.

Em adição a estes quatro complexos, as mitocôndrias de plantas possuem alguns componentes não comumente encontrados em mitocôndrias animais (Figura 6):

I) Desidrogenase do NAD(P)H Externo –

Proteínas periféricas encontradas na face externa da membrana interna. Estes componentes podem facilitar a oxidação de NADH e NADPH produzidos no citosol.

II) Desidrogenase do NAD(P)H Resistente à Rotenona–

Proteínas periféricas encontradas na face interna da membrana interna. Estes componentes, ao contrário do complexo I, são resistentes à rotenona.

III) Oxidase Alternativa –

Este complexo protéico permite a redução de O_2 com pequena produção de ATP. Esta oxidase alternativa, ao contrário do complexo IV, é pouco afetada pelos inibidores, cianeto, monóxido de carbono (CO) e azida.

Quando uma solução de cianeto (1 mM) é fornecida a tecidos animais que estão respirando ativamente, o complexo citocromo oxidase é inibido e a taxa respiratória cai para menos de 1% do valor inicial. No entanto, em tecidos de plantas, a respiração resistente ao cianeto pode representar de 10 a 25% e, em alguns tecidos, pode corresponder a mais de 100% do controle. A enzima ou o complexo responsável por este consumo de O_2 tem sido identificada em mitocôndrias de plantas, como um complexo conhecido como **oxidase alternativa**.

A oxidase alternativa é resistente ao cianeto (CN⁻), monóxido de carbono (CO) e azida, porém, ela é inibida especificamente por alguns compostos, particularmente o ácido salicilhidroxâmico (SHAM). Este complexo recebe elétrons diretamente do “pool” de ubiquinona, reduzindo o O_2 para H_2O (ver figura 6). Com isso, dois pontos de conservação de energia, nos complexos III e IV, não são utilizados e a energia passa a ser perdida como calor. Esta produção de calor parece ser importante em órgãos reprodutivos de algumas espécies (família Araceae), favorecendo a volatilização de certos compostos que atraem insetos polinizadores.

Sob condições de estresse, o aumento da atividade da oxidase alternativa pode contribuir para evitar o sobrefluxo de energia e a formação de radicais livres, efeitos que poderiam ser tóxicos à maquinaria mitocondrial.

e) Síntese de ATP acoplada ao fluxo de elétrons

A transferência de elétrons para o O_2 , do Complexo I até o Complexo IV, é acoplada à síntese de ATP, sendo que o número de ATP formado depende da natureza do doador de elétrons. Para o NADH, que doa os elétrons ao Complexo I, a relação ADP:O (número de ATP formados para cada dois elétrons transferidos para o oxigênio) é em torno de 2,5. Isto indica que uma molécula de NADH pode produzir até 2,5 ATP. Para o $FADH_2$, que efetivamente doa elétrons ao Complexo III, a relação ADP:O é em torno de 1,5. Para o ascorbato, que doa elétrons ao Complexo IV, a relação ADP:O é em torno de 1.

Resultados como os descritos acima têm levado à conclusão que existem três locais de conservação de energia, nos Complexos I, III e IV (Figura 6). Como esta conservação de energia representa uma conexão entre o fluxo de elétrons mitocondrial e a síntese de ATP, ela tem sido denominada de FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA.

Este tipo de fosforilação, de maneira similar a fotofosforilação (ver fotossíntese), é explicado pelo mecanismo quimiosmótico proposto por Mitchel (1961). O princípio básico da quimiosmose é que diferenças na concentração de íons e de potencial elétrico entre os dois lados de uma membrana são fontes de energia livre que podem ser utilizadas pela célula. Como a membrana interna da mitocôndria é impermeável para H^+ , um gradiente eletroquímico de H^+ pode ser formado. Assim, nos pontos de conservação de energia (ver complexos I, III e IV, na figura 6) o transporte de elétrons está acoplado ao transporte de H^+ para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu_{H^+}$). Os H^+ ao retornarem para a matriz mitocondrial, a favor do seu gradiente, liberam energia que é utilizada para a síntese de ATP.

O processo de síntese de ATP é catalisado por um complexo enzimático transmembranar, localizado na membrana interna da mitocôndria, conhecido como F_0 - F_1 sintase do ATP (representado na figura 6 como o complexo V). A porção hidrofóbica do complexo, F_0 , parece formar o canal através da membrana, o qual favorece o retorno do H^+ para a matriz mitocondrial. O sítio catalítico, a porção F_1 , é uma proteína periférica localizada na face interna da membrana interna, ou seja, no lado da matriz, onde ocorre a síntese de ATP a partir de ADP e P_i .

A teoria quimiosmótica também explica o mecanismo de ação dos desacopladores, um grande número de compostos químicos (dinitrofenol, detergentes, NH_3 , dentre outros) que tornam a membrana interna permeável a H^+ (Figura 7).

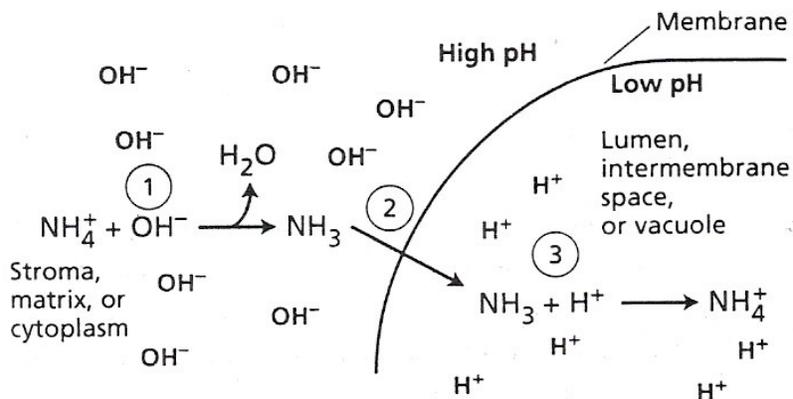


Figura 7 – Esquema mostrando a dissipação do gradiente de H^+ através da membrana, promovida pela NH_3 (Taiz & Zeiger, 1998).

Estes compostos dissipam o gradiente eletroquímico de prótons. Desta forma, o fluxo de elétrons pode continuar ocorrendo sem concomitante síntese de ATP. Isto explica por que as plantas não podem acumular NH_3 em suas células (Figura 7).

O gradiente eletroquímico de prótons também executa um importante papel no movimento de substratos e de produtos do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, para dentro e para fora da matriz mitocondrial. Embora o ATP seja sintetizado na matriz mitocondrial, a sua utilização pela célula ocorre fora da mitocôndria, sugerindo a necessidade de um mecanismo eficiente de transporte de ATP para fora desta organela. Este mecanismo envolve uma proteína transportadora na membrana interna, a qual catalisa a troca de ATP por ADP (este último é necessário para a síntese de ATP na mitocôndria). O gradiente de potencial elétrico gerado durante o transporte de elétrons (negativo dentro da matriz), favorece a saída da ATP^{4-} em troca por ADP^{3-} . O gradiente eletroquímico de H^+ também facilita a troca de fosfato inorgânico (P_i) e de piruvato, ambos para dentro da matriz mitocondrial, em troca por OH^- . Lembre-se que P_i^{1-} é necessário para a síntese de ATP e piruvato é o substrato para o ciclo de Krebs. Portanto, a existência de transportadores específicos na membrana interna garante o funcionamento normal da respiração.

Considerando-se as relações ADP:O de 2,5 para o NADH e 1,5 para o FADH_2 podemos dizer que uma molécula de sacarose, ao ser completamente oxidada para CO_2 , produz em torno de 60 moléculas de ATP.

Glicólise – 4 ATP (fosforilação ao nível do substrato)

4 NADH = 6 ATP (desidrogenase do NADH que aproveita o NADH citosólico não utiliza o primeiro ponto de conservação de energia. Por isso, cada NADH produzido no citosol produz apenas 1,5 ATP)

Matriz mitocondrial - 4 NADH = 10 ATP

Ciclo de Krebs - 4 ATP (fosforilação ao nível do substrato)

12 NADH = 30 ATP (não considerando o NADH produzido na conversão do piruvato para acetil-CoA)

4 FADH_2 = 6 ATP

TOTAL = 60 ATP produzidos para cada molécula de sacarose que é completamente oxidada até CO_2 e H_2O

f) A Via das Pentoses-Fosfato

A glicólise não é a única rota disponível para oxidação de glucose em plantas. A via oxidativa das pentoses-fosfato (Figura 8) pode também realizar esta tarefa, usando enzimas que são solúveis no citosol, podendo contribuir com 5 a 20% do fluxo de carbono respiratório.

As duas primeiras reações são irreversíveis e representam os eventos de oxidação desta via, convertendo glucose-6-fosfato (6C) em ribulose-5-fosfato (5C), com perda de um CO_2 e geração de duas moléculas de NADPH (Figura 8). O restante da via das pentoses-fosfato

consiste de uma série de interconversões metabólicas, que convertem a ribulose-5-fosfato em dois intermediários da glicólise (Frutose-6-fosfato e Gliceraldeído-3-fosfato).

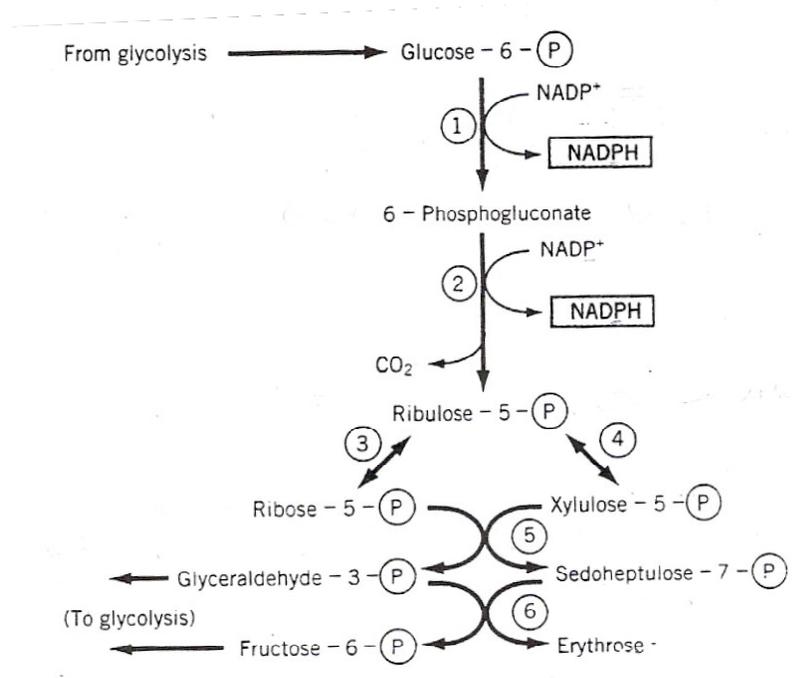


Figura 8 – A via das pentose-fosfato (Hopkins, 2000).

As funções atribuídas à via das pentoses-fosfato são:

- Produção de NADPH, que pode ser utilizado como fonte de poder redutor nas reações biossintéticas e, alternativamente, como fonte de energia que pode ser utilizada na CTE para produção de ATP (lembre-se da desidrogenase do NAD(P)H que existe na face externa da membrana interna da mitocôndria de plantas).
- Geração de intermediários do ciclo de Calvin (fotossíntese) que podem ser utilizados em folhas jovens, que não são completamente autotróficas (ribulose-5-P, ribose-5-P, eritrose-4-P, dentre outros).
- Produção da ribose-5-fosfato, precursor da ribose e da desoxirribose (síntese de ácidos nucléicos).
- Produção de eritrose-4-fosfato, que participa, juntamente com o fosfoenolpiruvato (PEP), da síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano e tirosina) e dos precursores da lignina, flavonóides e fitoalexinas.

g) A Respiração e a Formação de Esqueletos de Carbono

Como já comentamos anteriormente, uma das importantes funções da respiração, além da produção de ATP e poder redutor (NADH, NADPH e FADH₂), é a produção de esqueletos de carbono requeridos para a biossíntese de outras moléculas da célula. A biossíntese de

ácidos nucleicos, proteínas, celulose, lipídios e outras moléculas celulares requerem, além de energia (ATP e poder redutor), os esqueletos de carbono que formam as unidades estruturais básicas destas macromoléculas. Os mais importantes esqueletos de carbono, formados a partir de intermediários da glicólise e Ciclo de Krebs, são mostrados na figura 9.

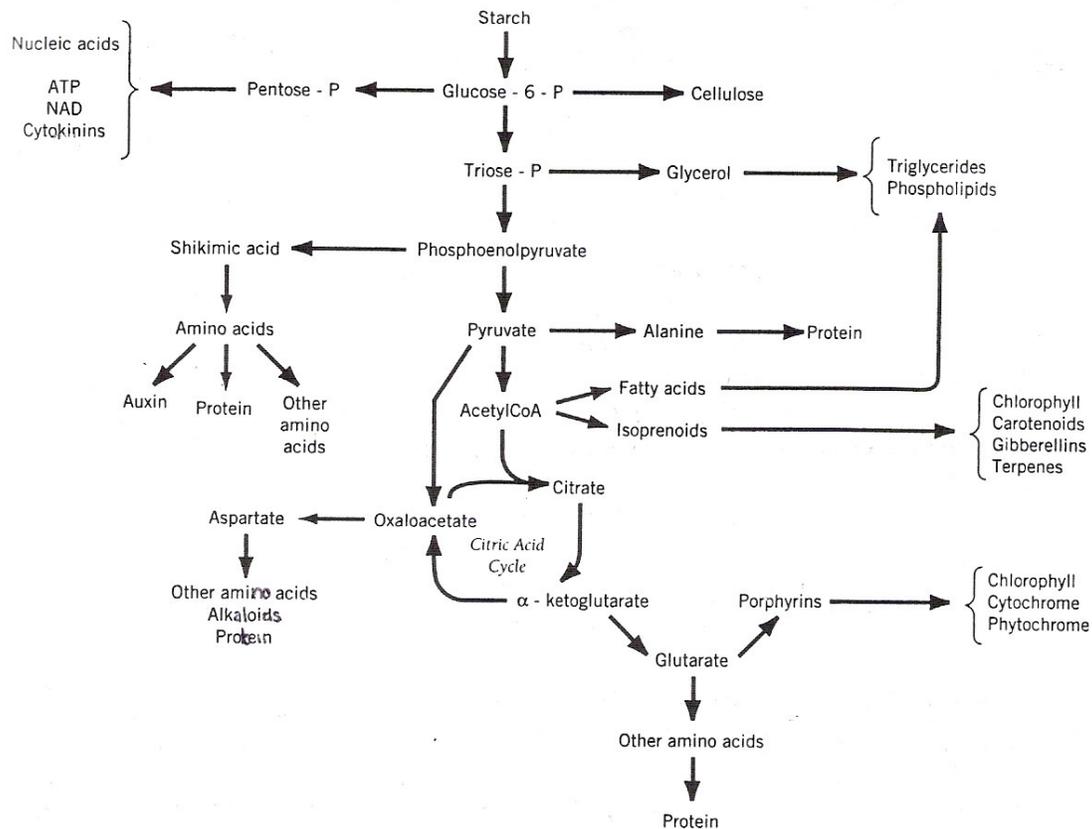


Figura 9 – O papel da respiração nos processos de biossíntese (Hopkins, 2000)

A retirada de intermediários da glicólise e do Ciclo de Krebs para a síntese de outras moléculas significa, obviamente, que nem todos os substratos da respiração poderão ser completamente oxidados até CO_2 e H_2O . Deve-se ter em mente, no entanto, que um suprimento adequado de ATP é também necessário, visto que as reações de biossíntese e inúmeras outras funções da célula também requerem esta fonte de energia. Assim, acredita-se que o fluxo de carbono através da respiração celular deve representar um balanço entre a demanda metabólica por ATP, de um lado, e o requerimento de poder redutor e de esqueletos de carbono, do outro. Por exemplo, quando a demanda por ATP é alta, maior percentagem dos substratos poderá ser completamente oxidada para produzir esta fonte de energia.

Outro importante ponto a ser considerado é que durante períodos de alta atividade biossintética, a retirada dos ácidos orgânicos do Ciclo de Krebs para a produção de outros compostos (aminoácidos, por exemplo), poderá reduzir significativamente o nível de cetoglutarato, paralisando ou inibindo o Ciclo de Krebs e, conseqüentemente, o processo respiratório. Isto, no entanto, é evitado através das chamadas **Reações Anapleróticas ou de Suplementação**. Estas reações catalisadas por enzimas citosólicas (carboxilase do PEP e desidrogenase do malato) e mitocondriais (desidrogenase do malato e enzima málica),

transferem moléculas da glicólise para o Ciclo de Krebs, garantindo o funcionamento normal da respiração (Estas reações são mostradas nas páginas 160 e 163).

3 – RESPIRAÇÃO NOS ÓRGÃOS VEGETAIS

a) Taxas de Respiração em Função da Idade

O estudo da respiração ao nível de órgãos ou da planta é mais complicado do que estudá-la em células individuais. A respiração na planta é normalmente estudada, medindo-se a absorção de O_2 ou a evolução de CO_2 , sendo que as taxas obtidas desta maneira são altamente variáveis. Em adição, as taxas de respiração diferem entre órgãos, mudando com a idade e o estágio de desenvolvimento e, são bastante influenciadas pela temperatura do ar, níveis de oxigênio, dentre outros fatores.

Como regra geral, a taxa respiratória reflete o nível de demanda metabólica. Assim, plantas, órgãos ou tecidos jovens respiram mais rapidamente do que plantas, órgãos ou tecidos velhos. A alta taxa de respiração durante os estádios iniciais de crescimento está presumivelmente relacionada aos requerimentos de energia e de esqueletos de carbono para as células que estão em processos de divisão e de alongamento. Quando a planta ou órgão aproxima-se da maturidade, o crescimento e as demandas metabólicas a ele associadas também decrescem (Figura 10).

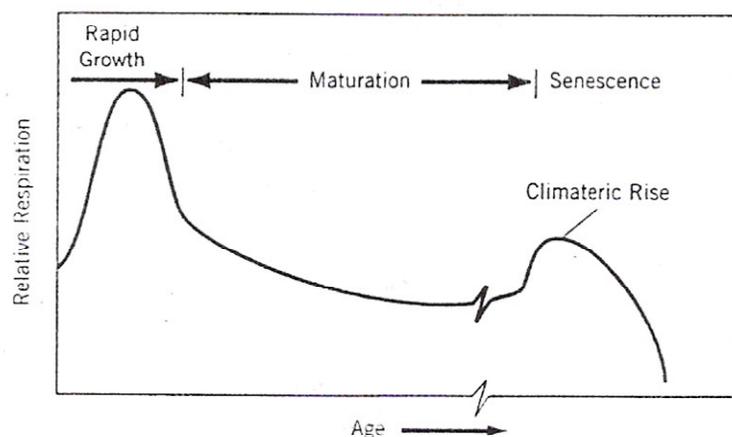


Figura 10 – Taxas de respiração em função da idade. Esta curva aplica-se à maioria das plantas herbáceas, tecidos e órgãos (Hopkins, 2000).

É importante destacar que alguns órgãos, especialmente folhas e alguns frutos, experimentam um aumento transitório na respiração, conhecido como **climatério**, o qual marca a senescência e as mudanças degenerativas que precedem a morte (Figura 10). No caso de frutos climatéricos, estas mudanças coincidem com o amadurecimento. Tipicamente, no climatério, aumento no consumo de O_2 é acompanhado pela queda na fosforilação oxidativa, indicando que a produção de ATP não está sendo acoplada ao transporte de elétrons.

OBS: A taxa de respiração em sementes germinando será estudada na Unidade XIII

b) Taxa de Respiração e Economia no Uso do Carbono

Um aspecto importante a ser considerado é que, na maioria das plantas, uma proporção significativa do carbono fotoassimilado é alocado para a respiração. Um levantamento feito com espécies herbáceas mostrou que 30 a 60% do ganho diário com a fotossíntese são consumidos pela respiração, e este valor decresce com a idade da planta. Em árvores lenhosas jovens as perdas podem chegar a um terço do carbono assimilado, podendo dobrar nas plantas adultas devido ao aumento na proporção de tecidos não fotossintéticos. Em áreas tropicais, a respiração pode consumir de 70 a 80% dos fotoassimilados, por causa da alta respiração noturna associada às elevadas temperaturas desta região.

Em um esforço para melhor entender o impacto da respiração sobre a economia **no uso** de carbono nas plantas, alguns fisiologistas têm tentado distinguir entre os gastos com o crescimento (carbono e energia) e os gastos com a manutenção das atividades e estruturas celulares (carbono e energia). Assim, têm sido propostos os termos Respiração de Crescimento e Respiração de Manutenção. A respiração de CRESCIMENTO inclui o carbono realmente incorporado (produção de esqueletos de carbono para a formação de parede celular, macromoléculas, etc.) mais o carbono respirado para produzir a energia, na forma de ATP e poder redutor (NADPH, NADH, FADH₂), necessária para as reações de biossíntese e para o crescimento. A RESPIRAÇÃO DE MANUTENÇÃO, por outro lado, fornece a energia para os processos que não resultam em incremento de matéria seca (crescimento), tais como: “turnover” de moléculas orgânicas, manutenção das estruturas de membranas e troca de solutos, dentre outros. Esta respiração de manutenção é baixa em plantas e órgãos jovens que estão em processo de rápido crescimento (Figura 11). No entanto, em órgãos que terminaram o seu crescimento, a respiração de manutenção pode corresponder a uma elevada percentagem da respiração total. Em folhas maduras, por exemplo, ela aproxima-se de 100% de toda a respiração.

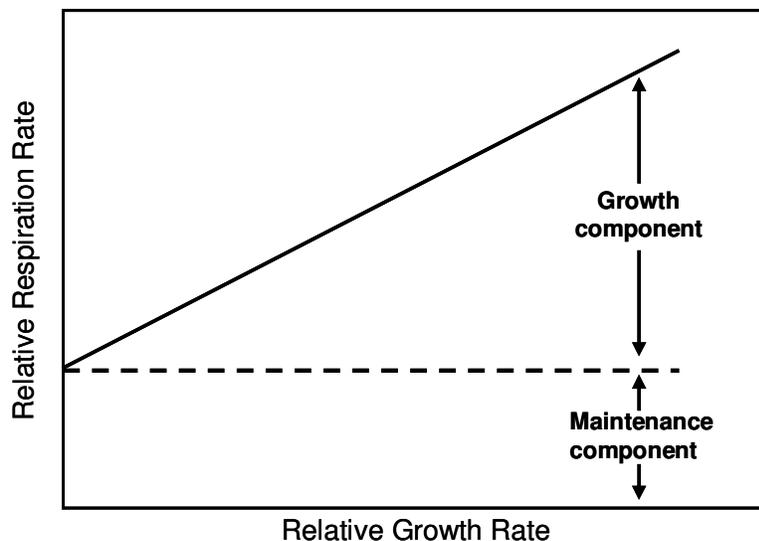


Figura 11 – Relação entre a taxa de crescimento do órgão e a respiração de manutenção (Hopkins, 2000).

Como vimos anteriormente, a respiração produz a energia metabólica que é requerida para vários processos de crescimento, contribuindo, portanto, para o aumento na produção de biomassa. No entanto, ela pode consumir carbono com pouco ou nenhum aproveitamento de

energia útil. Visto que, esta última situação representa uma perda de carbono pela planta, tem-se assumido que uma menor taxa de respiração pode favorecer uma maior economia de carbono, resultando em maior crescimento e produtividade. Corroborando com esta afirmação, alguns estudos têm mostrado a existência de correlação inversa entre a taxa de respiração e a taxa de crescimento (Figura 12). De acordo com estes estudos, os genótipos mais produtivos foram os que apresentaram menor taxa de respiração de manutenção nos tecidos maduros. Em outras palavras, quanto menor o consumo de carbono na respiração de manutenção, maior proporção do carbono estará disponível para o crescimento.

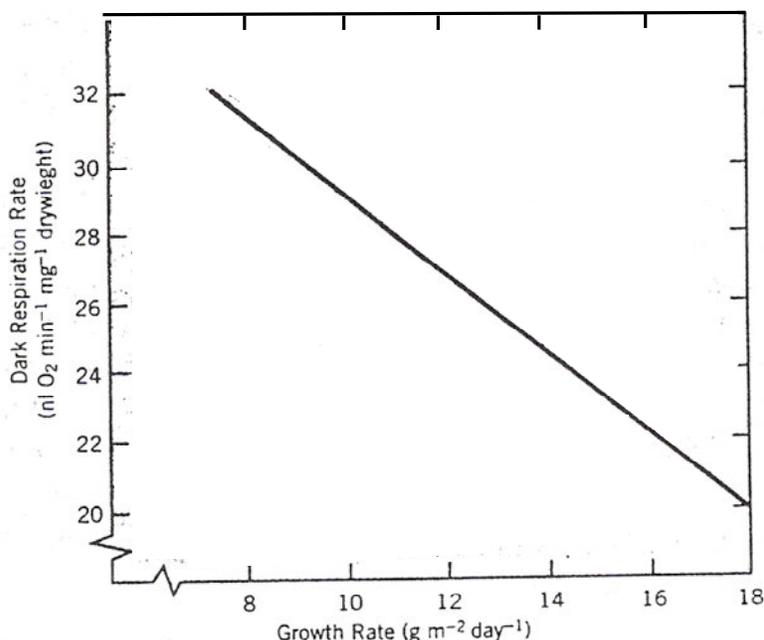


Figura 12 – A correlação inversa entre a taxa de respiração e a taxa de crescimento em genótipos de *Lolium pratense* (Hopkins, 2000).

4 – FATORES QUE AFETAM A RESPIRAÇÃO

a) Disponibilidade de substrato

A respiração depende da disponibilidade de substratos. Plantas pobres em amido, frutanas ou açúcares de reserva, respiram em taxas consideravelmente baixas. Plantas deficientes em açúcares aumentam sensivelmente suas taxas de respiração quando supridas com os referidos substratos. De fato, a taxa de respiração de folhas é maior no início da noite, quando os níveis de açúcares são altos, do que antes de iniciar o dia, quando os níveis de substratos são baixos. Além disso, folhas sombreadas (no interior da copa de uma árvore, por exemplo) apresentam menores taxas de respiração do que folhas expostas ao sol. Isto se deve, provavelmente, à menor taxa de fotossíntese e, conseqüentemente, menor produção de substratos nas folhas sombreadas.

É interessante que, quando ocorre uma forte deficiência de açúcares, as proteínas podem ser utilizadas como substrato para respiração. Estas proteínas são primeiramente hidrolisadas produzindo aminoácidos, os quais são degradados nas reações da glicólise e ciclo de Krebs.

b) Luz

Os efeitos da luz sobre a respiração mitocondrial têm sido motivos de considerável discussão. Alguns consideram que a respiração mitocondrial decresce na luz, porém não se conhece ao certo a intensidade deste efeito. Na realidade, a tentativa para estudar a respiração em folhas verdes tem levado as conclusões conflitantes. Estas variam desde completa inibição da atividade mitocondrial, operação parcial do ciclo de Krebs, ou até estímulo da respiração pela luz. O problema reside na dificuldade de **se** medir a respiração em um período em que a troca de gases é dominada pelo fluxo de CO₂ e O₂ devido a fotossíntese, a reciclagem de CO₂ dentro da folha e a troca de metabólitos entre cloroplastos e mitocôndrias. **Alguns acreditam que pelo menos uma operação parcial do ciclo de Krebs é necessária, para fornecer esqueletos de carbono para a síntese de compostos durante o dia.**

OBS: Mutantes sem o complexo respiratório em folhas fotossintetizantes sofrem inibição do desenvolvimento foliar de da fotossíntese.

c) Temperatura

O coeficiente de temperatura (Q₁₀) é usado para descrever o efeito da temperatura sobre a respiração.

$$Q_{10} = \frac{\text{Taxa de Respiração em } (t + 10^{\circ}\text{C})}{\text{Taxa de Respiração em } t^{\circ}\text{C}}$$

Em temperaturas entre 5 e 25 ou 30°C, a respiração aumenta exponencialmente com a temperatura e o valor do Q₁₀ fica em torno de 2,0. Nesta faixa de temperatura, a taxa de respiração dobra para cada aumento de 10°C, o que está de acordo com o comportamento típico das reações enzimáticas. Em temperaturas acima de 30°C, o valor de Q₁₀ na maioria das plantas começa a cair. Quando a temperatura aproxima-se de 50 a 60°C, a desnaturação térmica das enzimas respiratórias e danos sobre as membranas, praticamente paralisam a respiração mitocondrial.

d) Oxigênio

Como acceptor final de elétrons, a disponibilidade de O₂ é, obviamente, um fator determinante da taxa respiratória. No entanto, sob condições normais, o oxigênio raramente é um fator limitante.

Porém, existem algumas situações onde a disponibilidade de O₂ pode tornar-se um fator limitante. Por exemplo, em tecidos com baixa relação superfície/volume, como tubérculos de batata, a lenta difusão de O₂ pode restringir a respiração no interior destes órgãos. O suprimento de O₂ é também comprometido em cultivos inundados, onde a respiração mitocondrial torna-se comprometida, principalmente em espécies não adaptadas.

Nestes casos, pode-se verificar aumento na respiração anaeróbica (principalmente a fermentação alcoólica). Este tipo de respiração, por ser menos eficiente (produz pouco ATP) pode levar a um maior consumo de carboidratos (Efeito Pasteur).

BIBLIOGRAFIA

- BEWLEY, J. D., BLACK, M. **SEEDS: Physiology of Development and Germination.** 2nd ed. New York, Plenum Press, 1994, 445p.
- FERRI, M. G. (Coord.) **Fisiologia Vegetal, v. 1.** 2nd ed. São Paulo: EPU, 1985, 361p.
- HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology.** 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000, 512p.
- SALISBURY, F. B., ROSS, C. W. **Plant Physiology.** 4th ed. California: Wadsworth Publishing Company, Inc., 1991, 682p.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant Physiology.** 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998, 792p.

ESTUDO DIRIGIDO Nº 06

ASSUNTO: RESPIRAÇÃO

1. Mostre a equação geral da respiração partindo da sacarose.
2. Quais os principais substratos utilizados na respiração?
3. Calcule o quociente respiratório (QR) do ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$), do ácido málico ($C_4H_6O_2$) e da frutose ($C_6H_{12}O_6$).
4. Quais as funções da glicólise?
5. Discuta sobre o destino do piruvato formado na glicólise.
6. Quais as funções do Ciclo de Krebs?
7. Mostre a localização da Cadeia de Transporte de Elétrons. Esquematize a composição bioquímica da CTE de plantas.
8. Qual a diferença entre fosforilação ao nível do substrato e fosforilação oxidativa?
9. Qual a função do oxigênio na respiração?
10. Mostre como a síntese da ATP na mitocôndria é explicada pelo Mecanismo Quimiosmótico proposto por Mitchel (1960).
11. Faça um balanço energético da oxidação completa de um mol de glucose através da glicólise, Ciclo de Krebs e CTE.
12. Mostre graficamente a relação entre a taxa de respiração e a idade de um órgão vegetal.
13. Defina respiração de manutenção e respiração de crescimento.
14. Mostre como a temperatura pode afetar a respiração vegetal. Avalie possíveis efeitos sobre a produtividade.