

# Bioquímica Geral

## Sumário

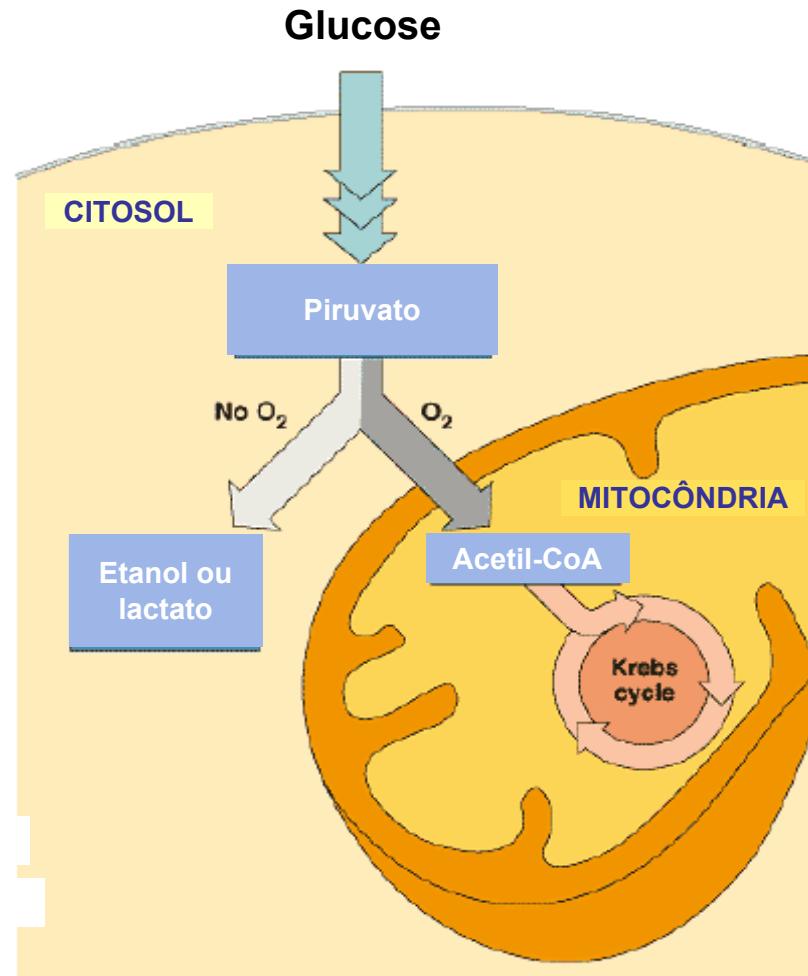
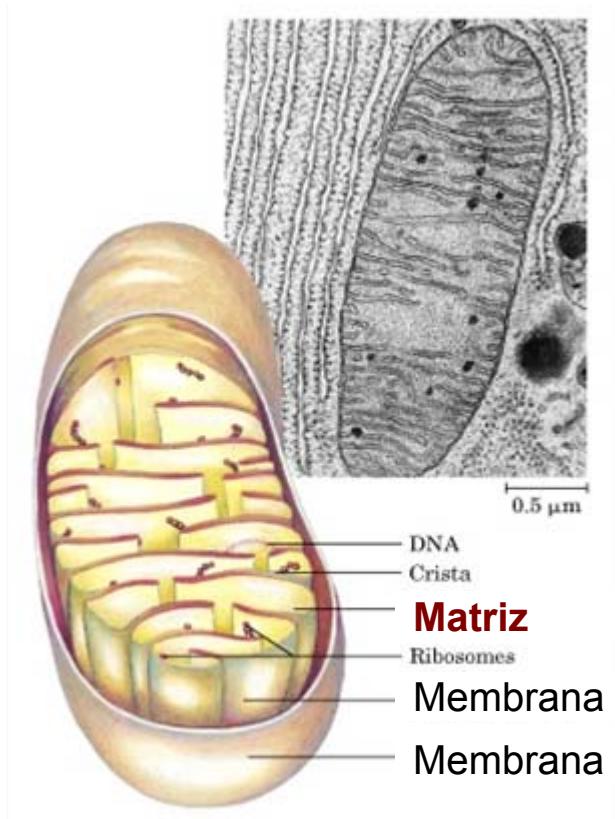
### CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

#### Objectivos do ciclo de Krebs

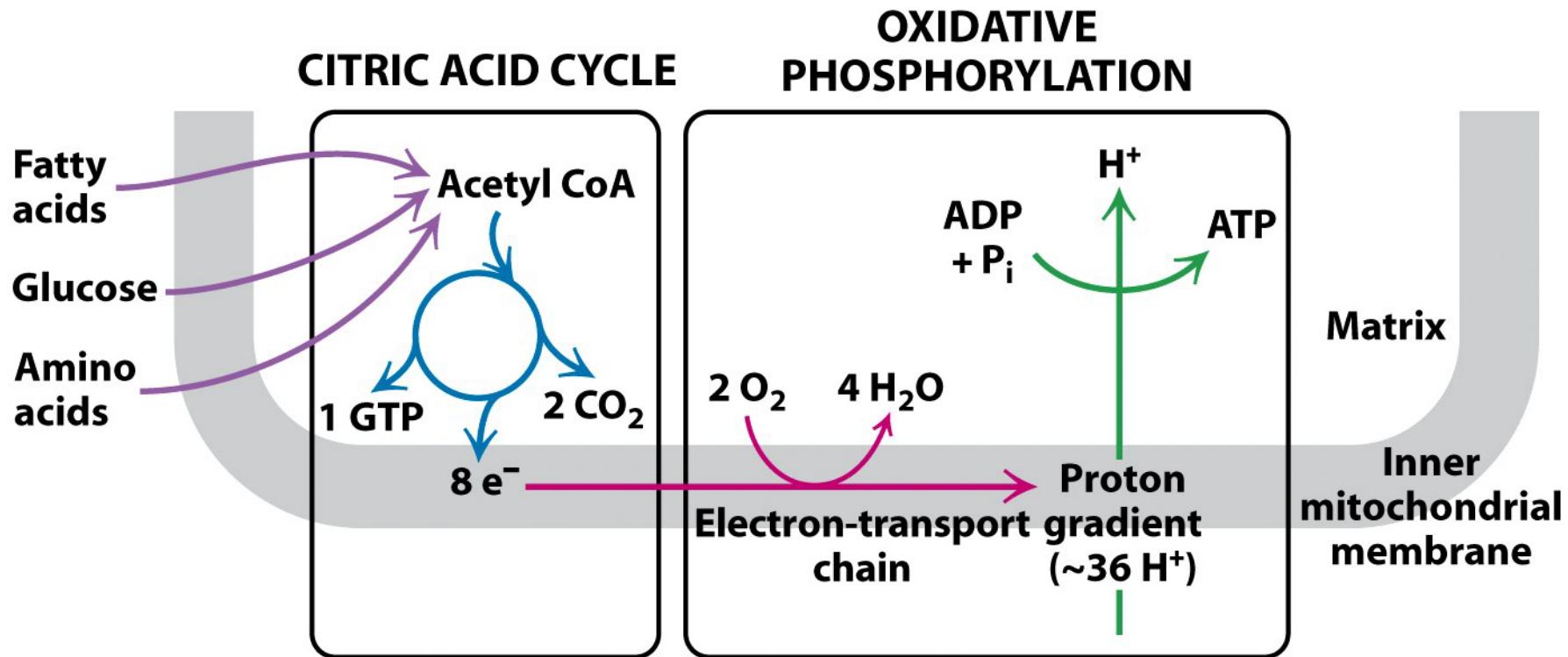
- Localização celular
- Oxidação do piruvato a acetil-CoA
- Reacções do ciclo de Krebs (enzimas, mecanismos,  $\Delta G^\circ'$ )
- Balanço global
- Regulação do ciclo do Krebs
- O ciclo de Krebs na biossíntese (carácter anfibólico do ciclo)
- Reacções anapleróticas

# Localização celular do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos)

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial



# O ciclo do ácido cítrico constitui o primeiro passo da respiração celular

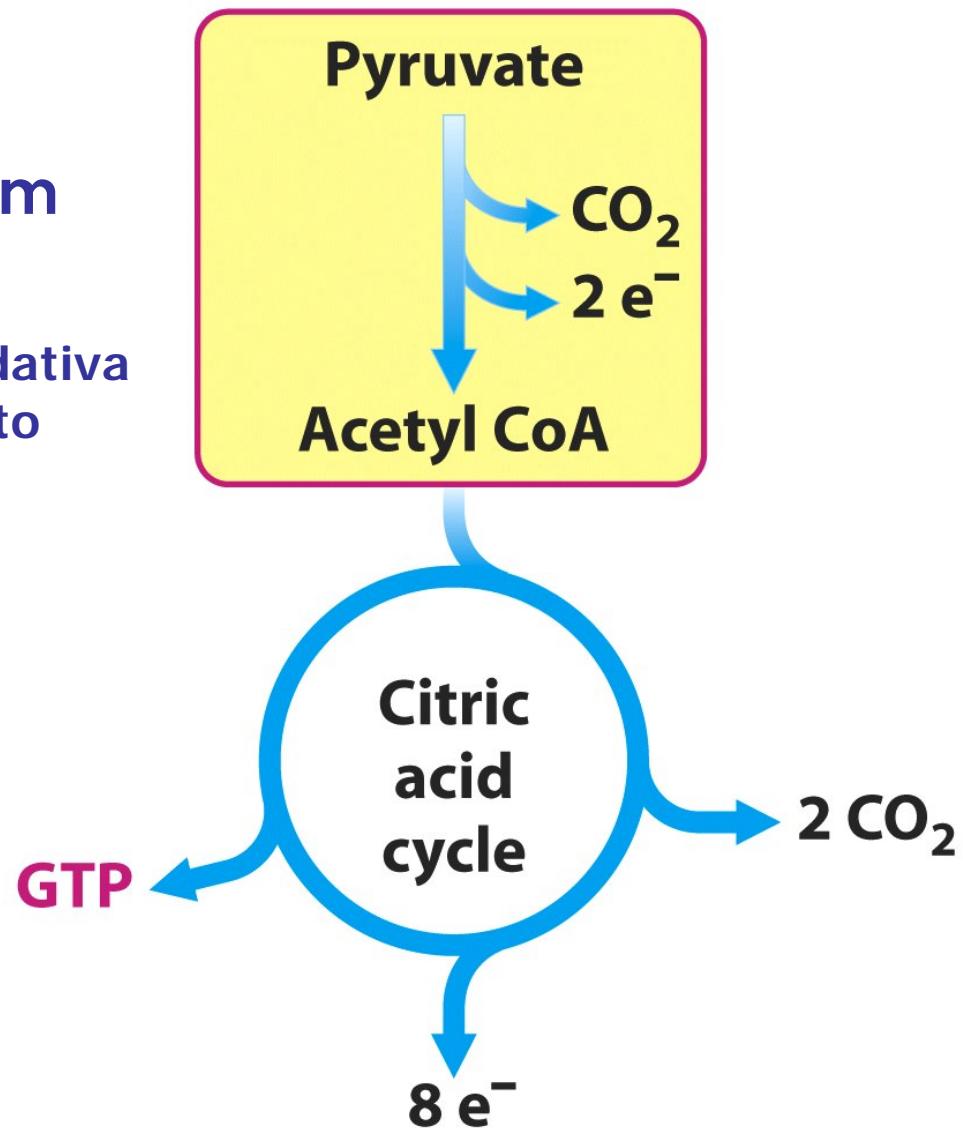


É o caminho final comum para a oxidação completa das moléculas que fornecem energia (açúcares, ácidos gordos, aminoácidos). Os electrões de alta energia removidos dos nutrientes são transportados para a cadeia respiratória onde reduzem o oxigénio a água. A energia libertada é utilizada para gerar um gradiente electroquímico de protões que é convertido em ATP (fosforilação oxidativa).

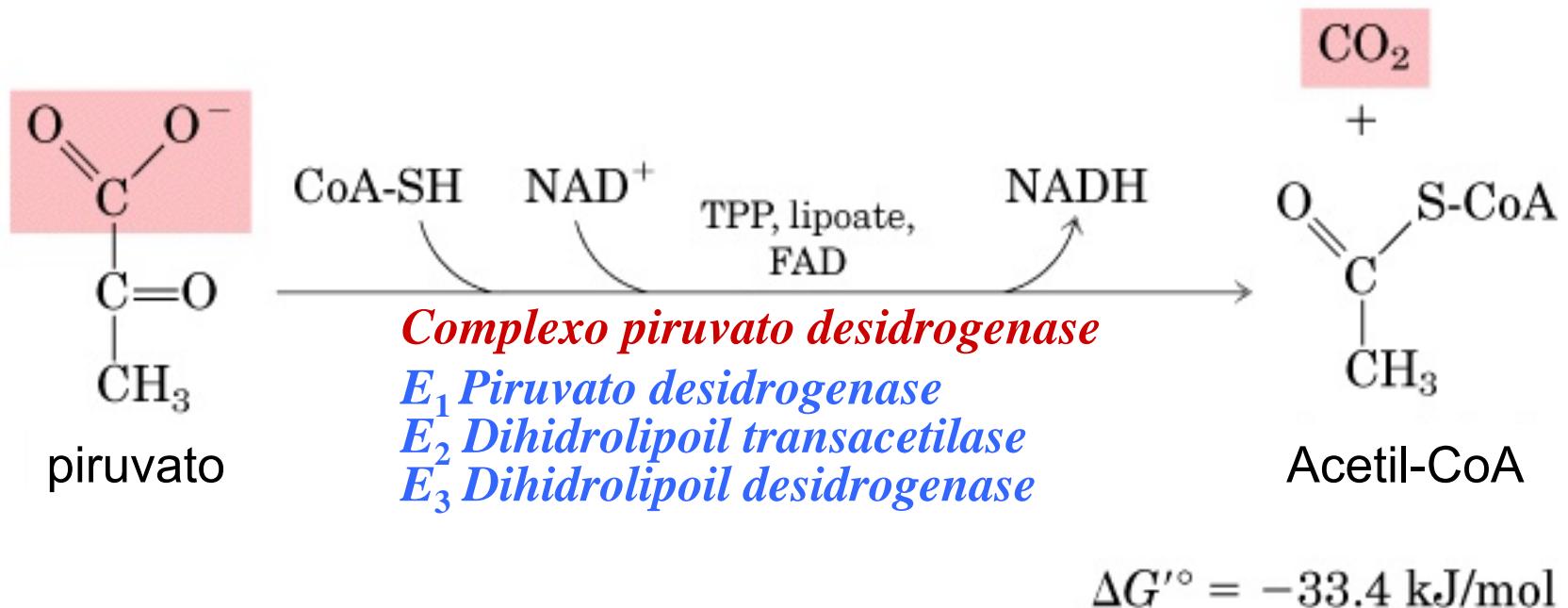
# Ligaçāo entre a glicólise e o ciclo do ácido cítrico

**Conversão do piruvato em Acetil-CoA e CO<sub>2</sub>**

Reacção de descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase.



# Formação do Acetil-CoA



A reacção de descarboxilação oxidativa do piruvato a acetato é uma reacção irreversível catalisada por um complexo multienzimático. Liberta-se CO<sub>2</sub> e NADH.



# A conversão do piruvato em acetilCoA envolve 3 passos:

- (1) descarboxilação
- (2) oxidação
- (3) transferência para a coenzima A

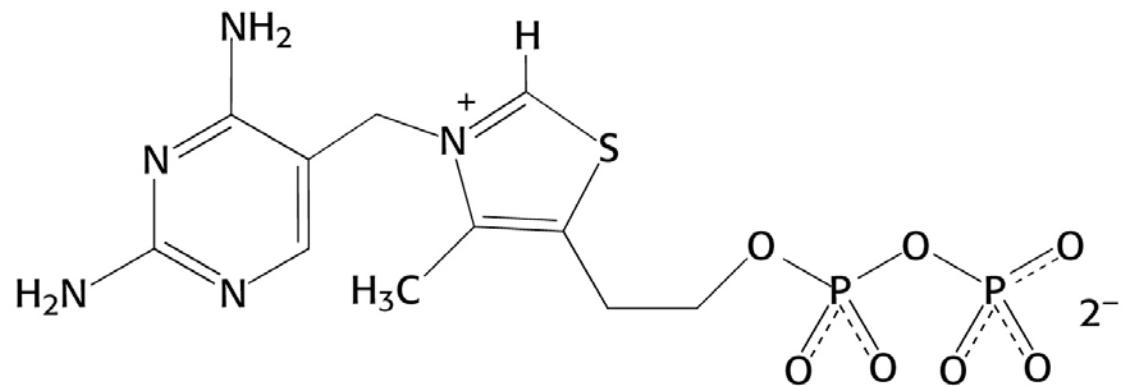
Os passos têm que ser acoplados para que a energia resultante da descarboxilação seja conservada na formação do acetil-CoA (composto que tem uma ligação tioéster rica em energia).

O acoplamento é conseguido pela integração estrutural dos 3 tipos de enzimas no complexo multienzimático.

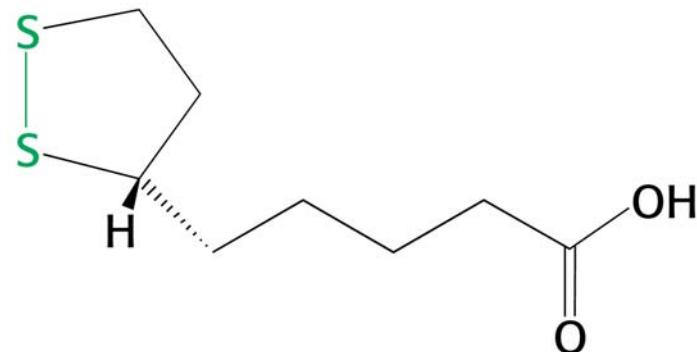
**TABLE 17.1 Pyruvate dehydrogenase complex of *E. coli***

Enzyme	Abbreviation	Number of chains	Prosthetic group	Reaction catalyzed
Pyruvate dehydrogenase component	E <sub>1</sub>	24	TPP	Oxidative decarboxylation of pyruvate
Dihydrolipoyl transacetylase	E <sub>2</sub>	24	Lipoamide	Transfer of acetyl group to CoA
Dihydrolipoyl dehydrogenase	E <sub>3</sub>	12	FAD	Regeneration of the oxidized form of lipoamide

## Cofatores do complexo enzimático piruvato descarboxilase

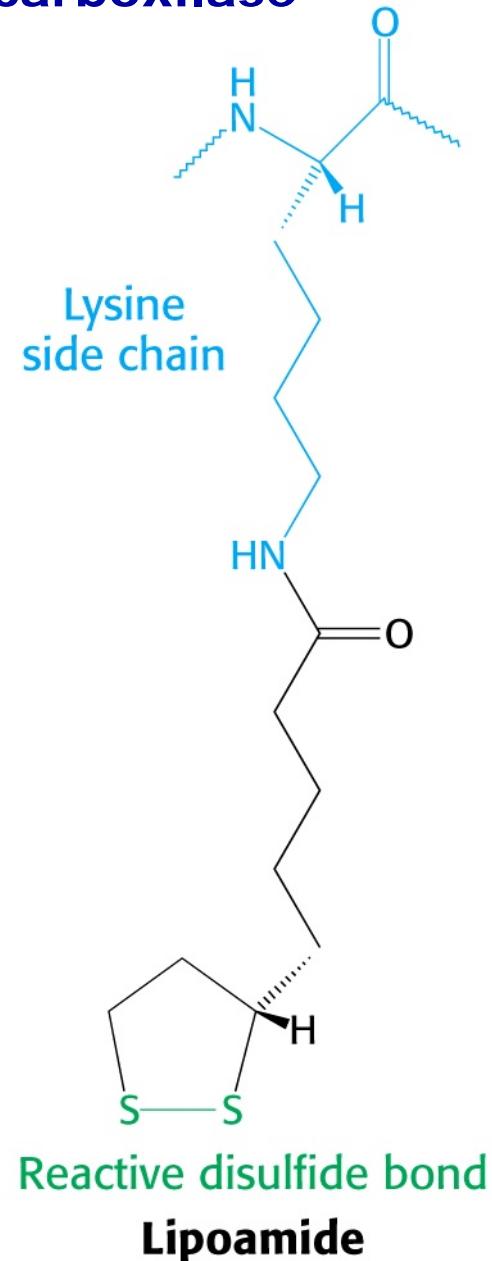


**Thiamine pyrophosphate (TPP)**



**Lipoic acid**

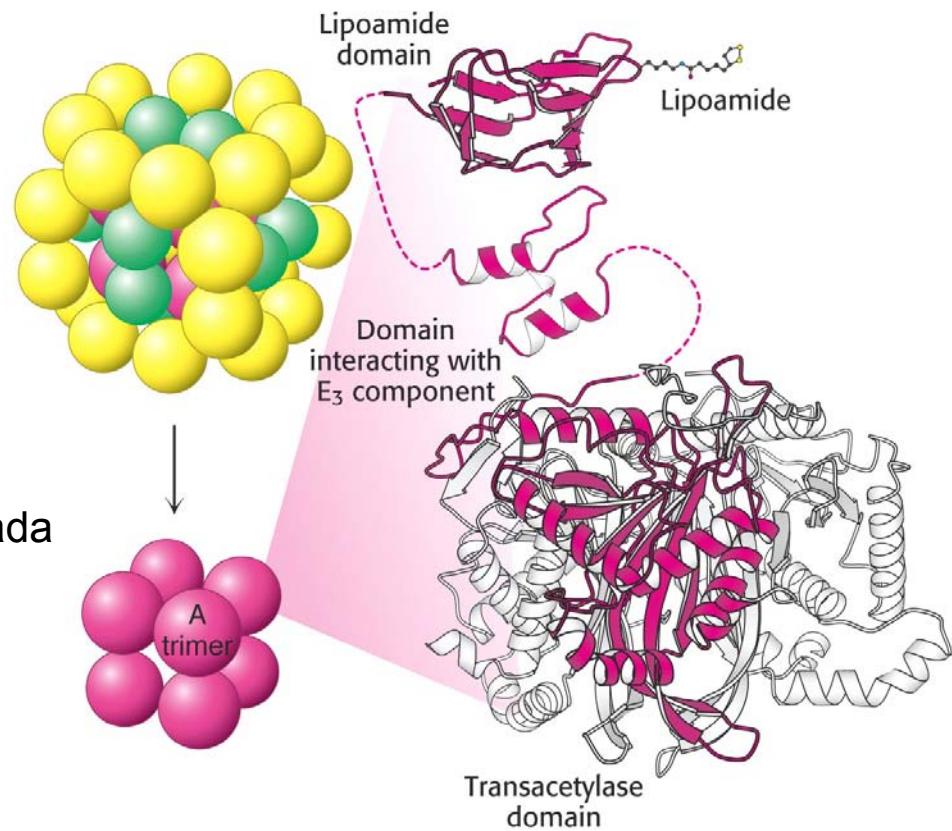
e também Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD)



# O complexo multienzimático tem 3 enzimas e 3 cofactores:

TPP  
lipoamida  
FAD

No centro do complexo multienzimático encontra-se a enzima transacetylase: cada esfera rosa representa um trímero composto por 3 subunidades  $E_2$ . Cada subunidade  $E_2$  tem 3 domínios.



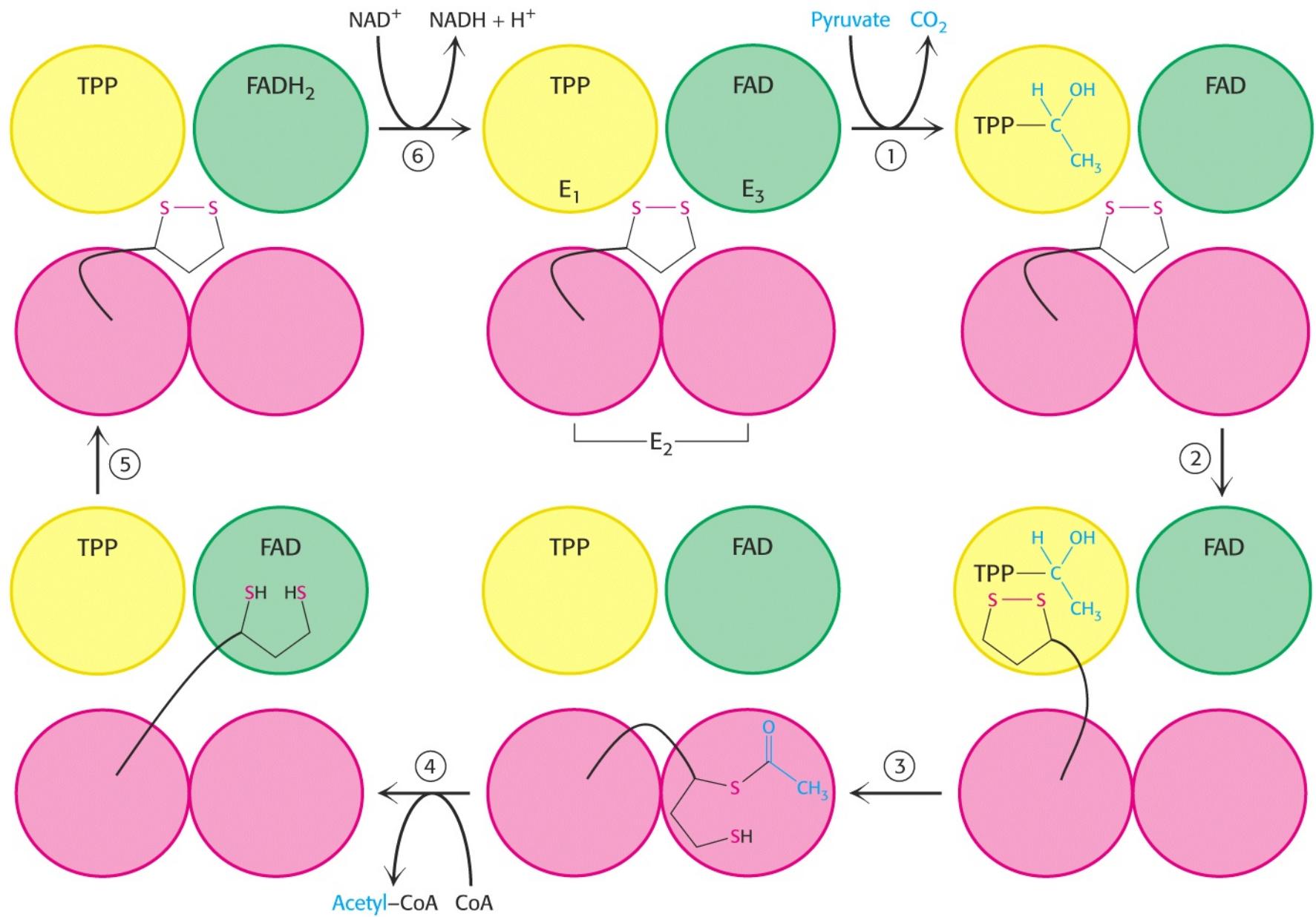
Ligações flexíveis permitem que a lipoamida se move entre os centros activos das diferentes enzimas do complexo multienzimático:

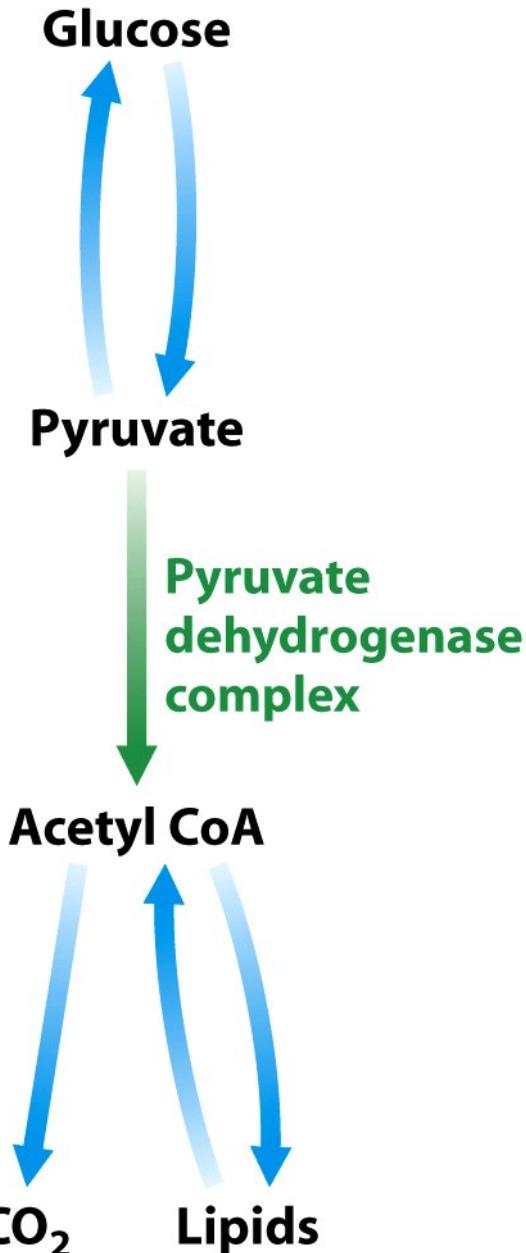
$E_1$ : *piruvato desidrogenase* (TPP)

$E_2$ : *dihidrolipoil transacetylase* (lipoamida)

$E_3$ : *dihidrolipoil desidrogenase* (FAD)

# Ciclo catalítico do complexo piruvato desidrogenase

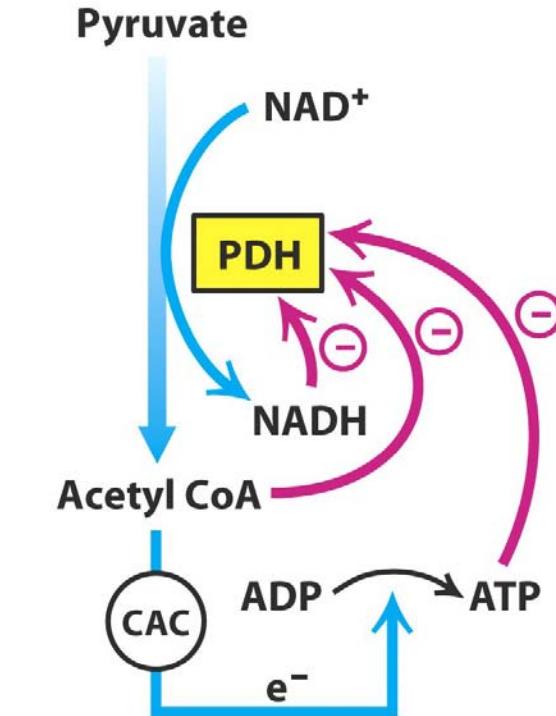




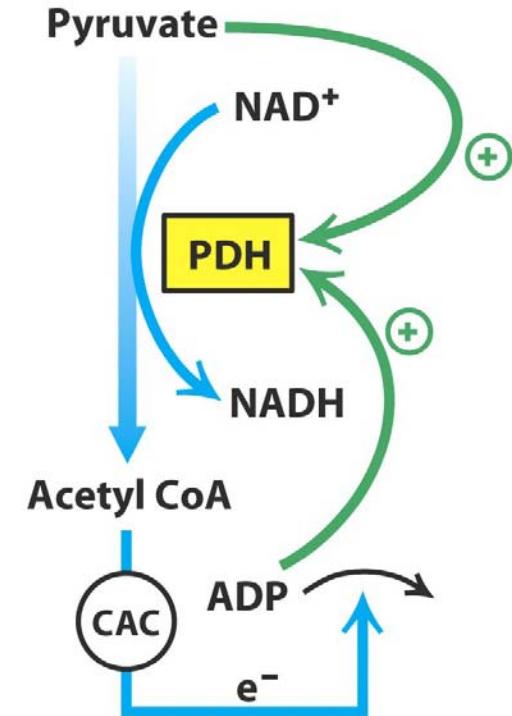
## A conversão de piruvato a acetil-CoA é regulada

Nos animais o acetil-CoA não pode ser convertido em glucose

(A) HIGH ENERGY CHARGE

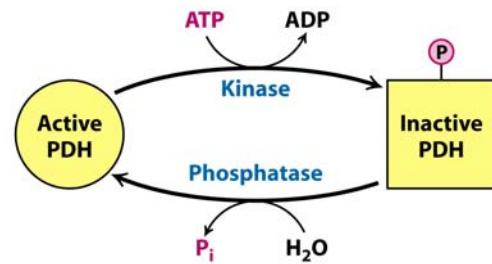


(B) LOW ENERGY CHARGE



PDH também é regulada por fosforilação

razões elevadas  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ ;  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$  e  $[\text{acetilCoA}]/[\text{CoA}]$  activam a cinase inibindo a PDH.



# CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

## Objectivos

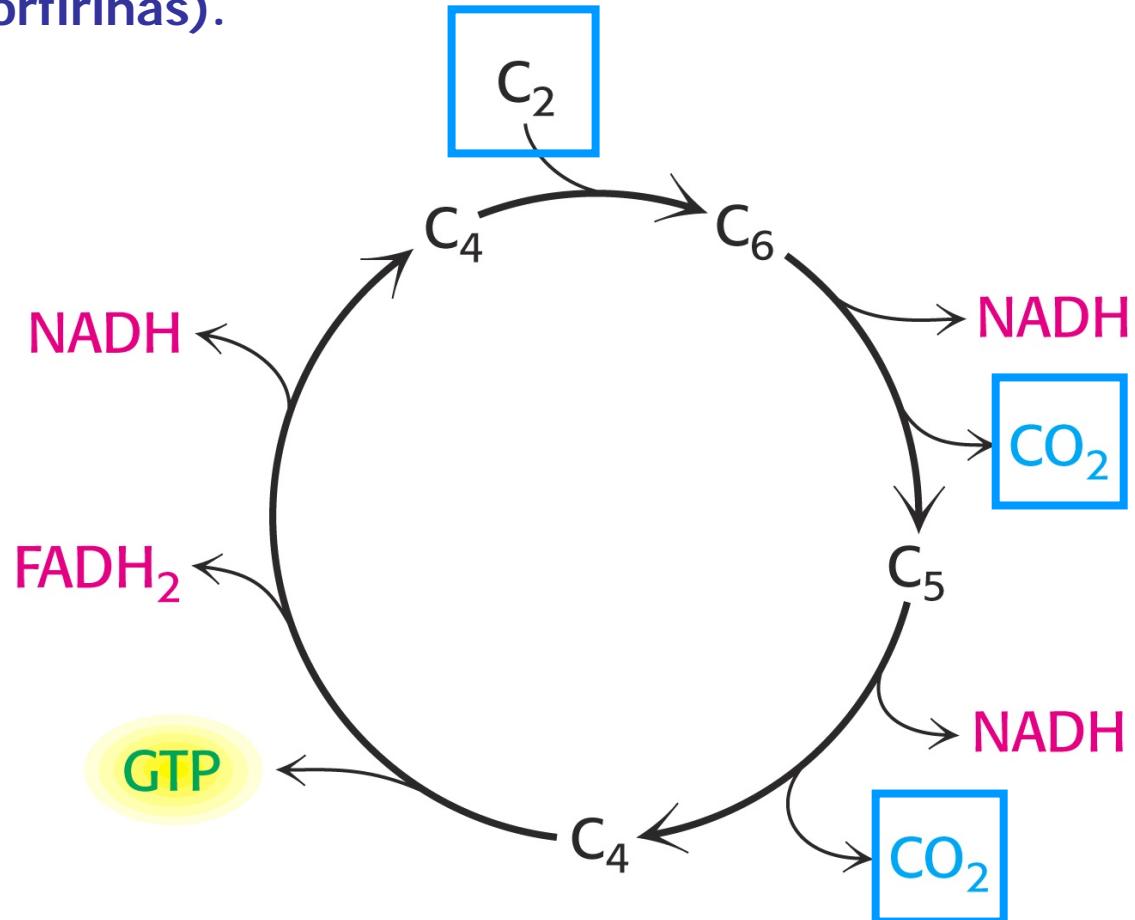
- 1- oxidação completa de unidades de 2 carbonos para obtenção de energia.
- 2- fonte de precursores para biossíntese (aminoácidos, bases aromáticas, colesterol, porfirinas).

## Balanço global

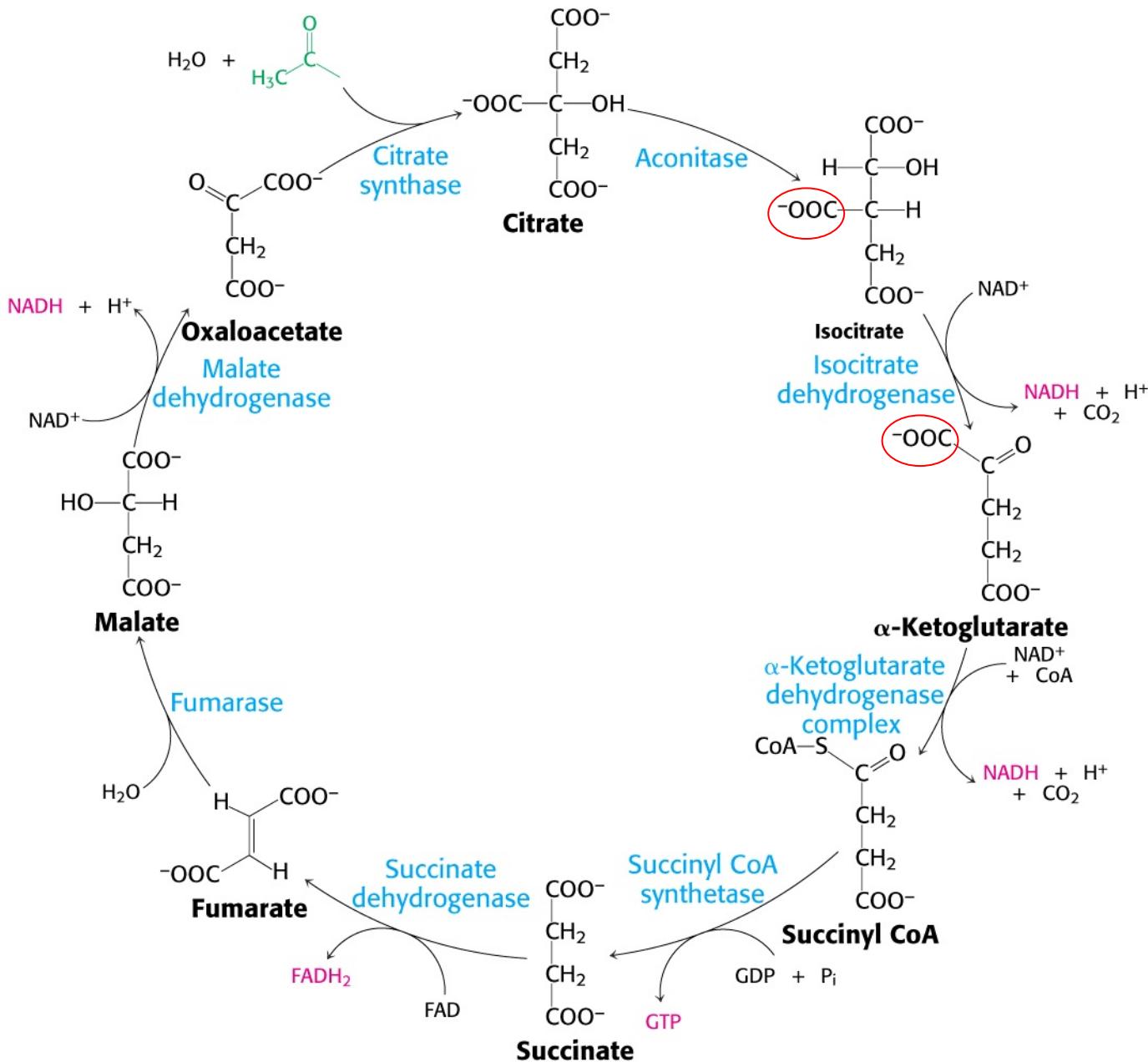
A oxidação de uma unidade de 2 carbonos ( $C_2$ ) produz  $2CO_2$ , 1GTP e electrões de alta energia: 3NADH e 1FADH<sub>2</sub>.

Nota:

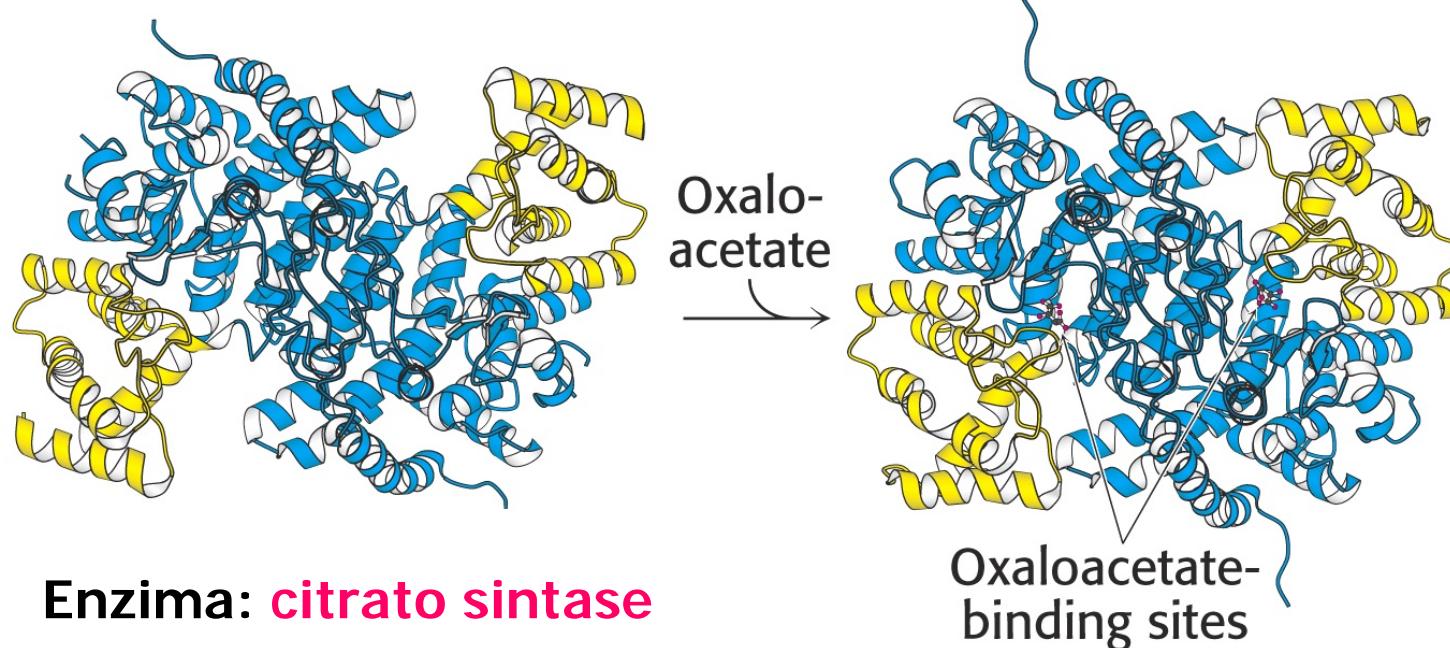
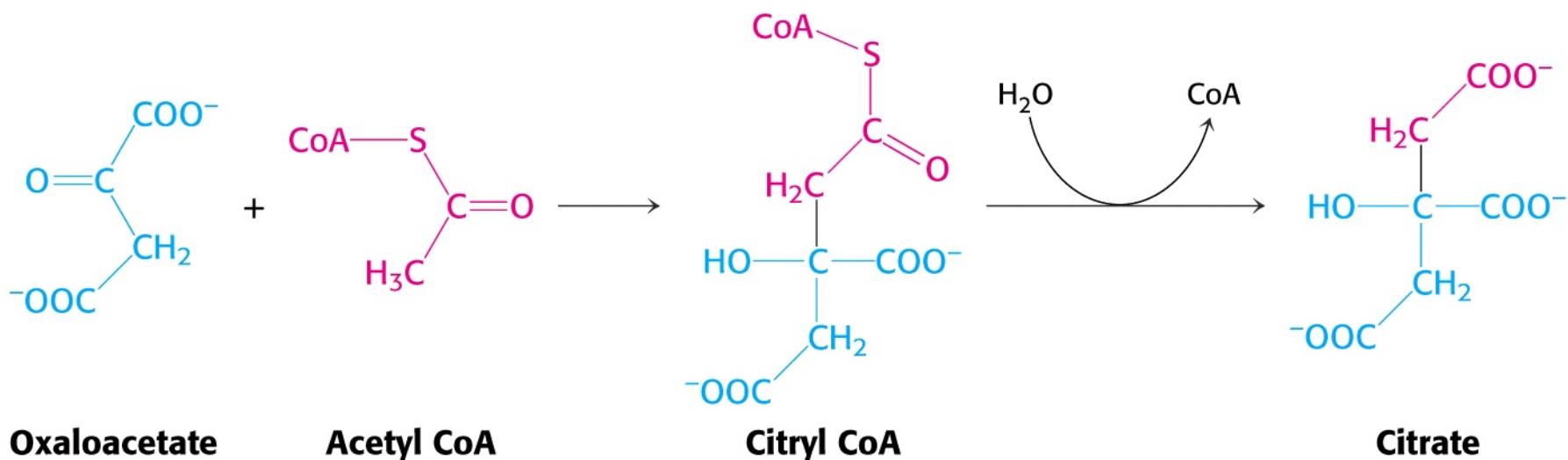
O oxigénio molecular não intervém directamente nas reacções do ciclo de Krebs, mas é necessário para reoxidar os cofactores reduzidos NADH e FADH<sub>2</sub> que se formam. O ciclo do ácido cítrico só funciona em condições aeróbias.



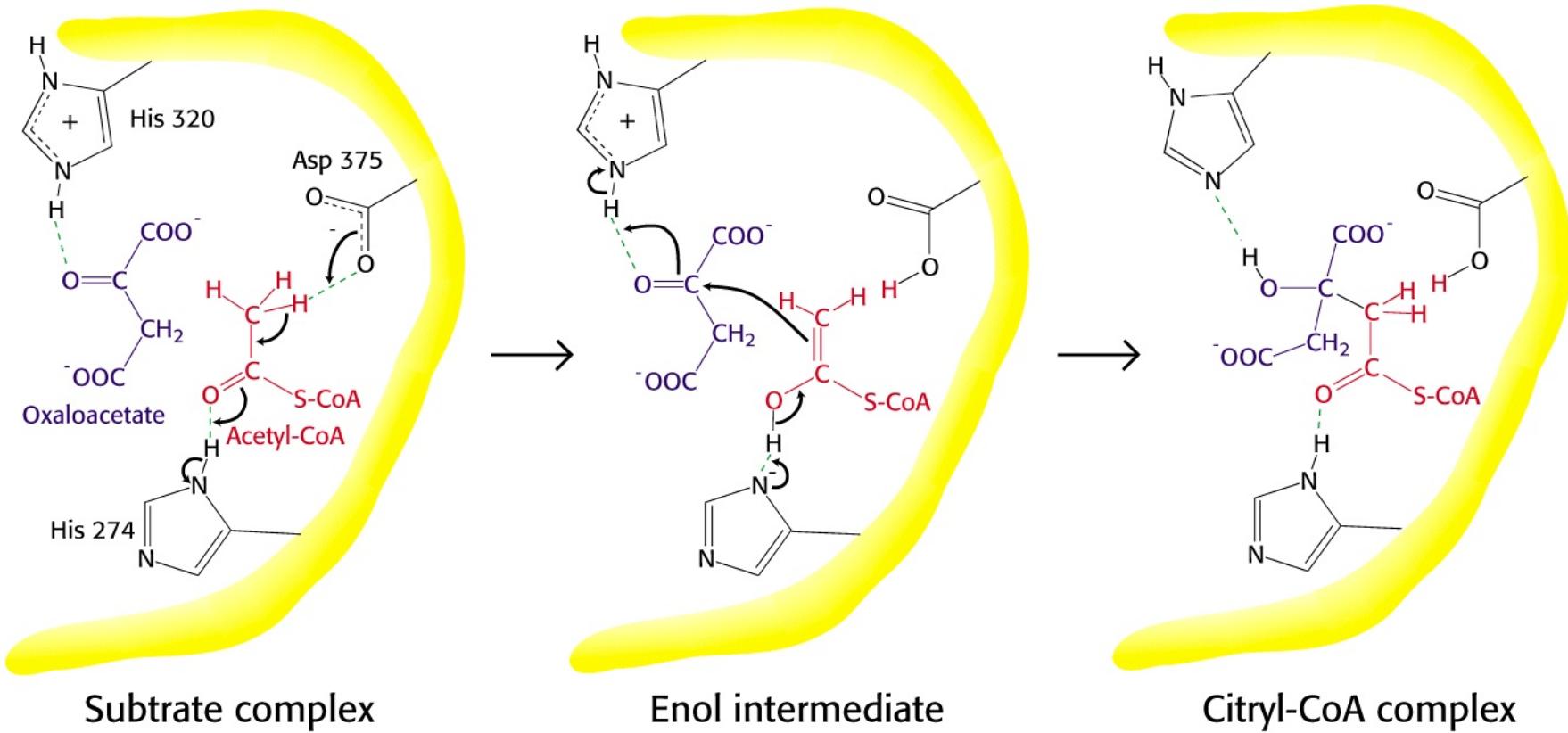
# Reacções do ciclo do ácido cítrico



# Condensação de uma unidade C2 com uma unidade C4



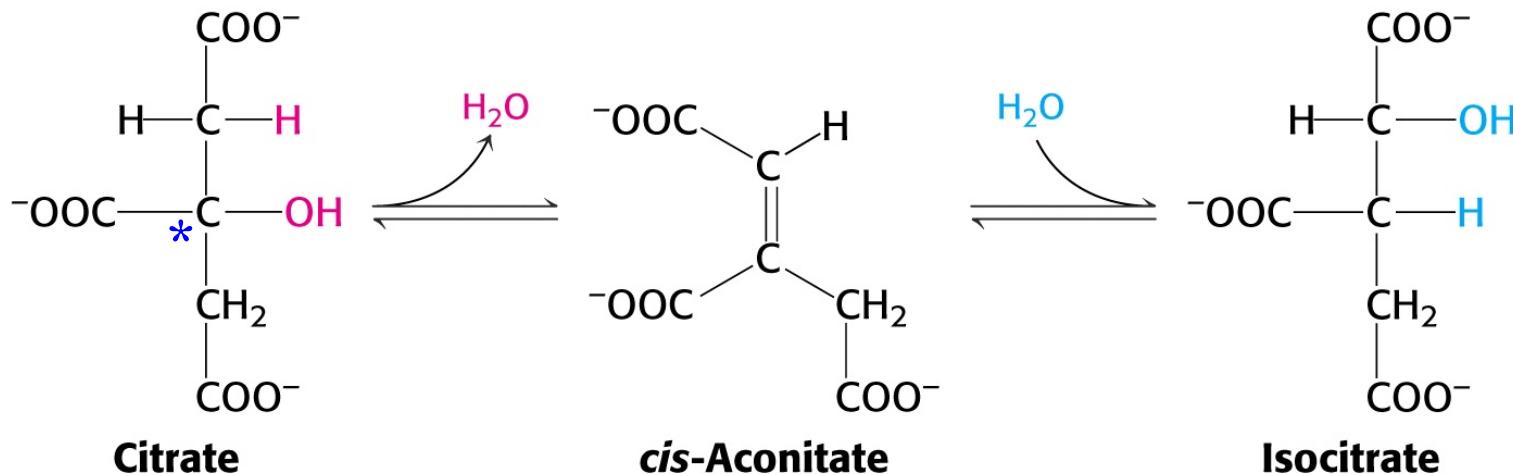
# Mecanismo catalítico da citrato sintase



## Mecanismo sequencial ordenado

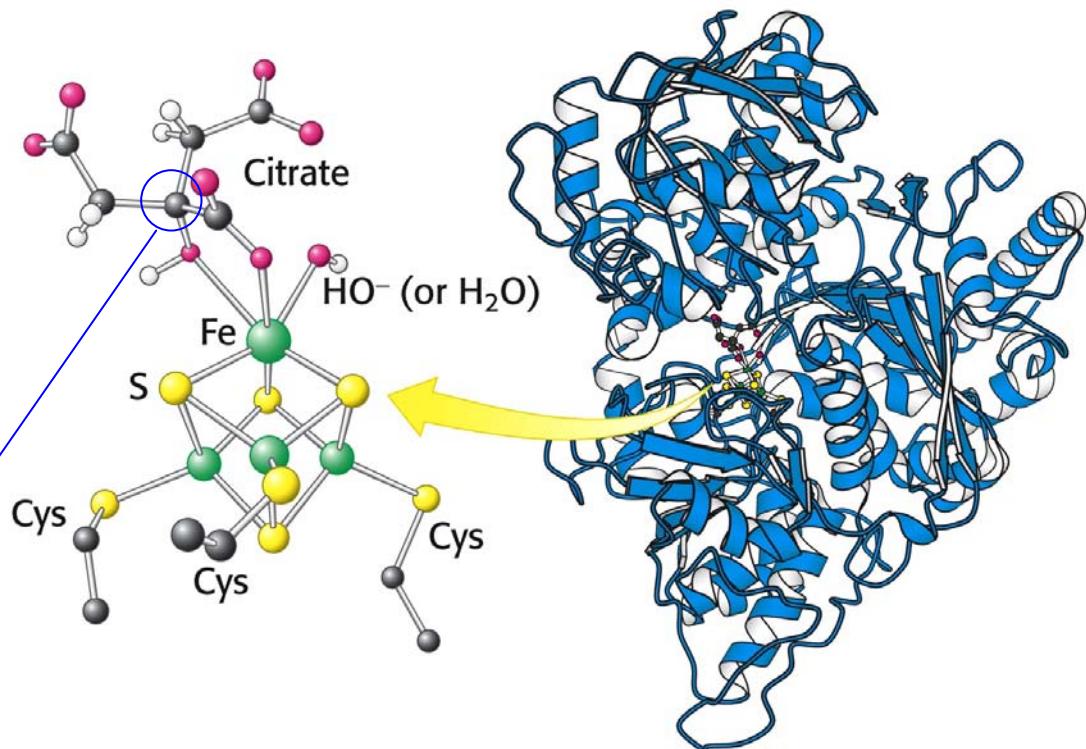
1. Liga-se o oxaloacetato e dá-se uma alteração conformacional que cria o sítio de ligação do acetilCoA.
2. Liga-se o acetilCoA e forma-se o citrilCoA. Nova alteração conformacional posiciona os resíduos para se dar a hidrólise da ligação tioéster.
3. Hidrólise da ligação tioéster, libertação do CoA e depois do citrato.

# Isomerização do citrato a isocitrato



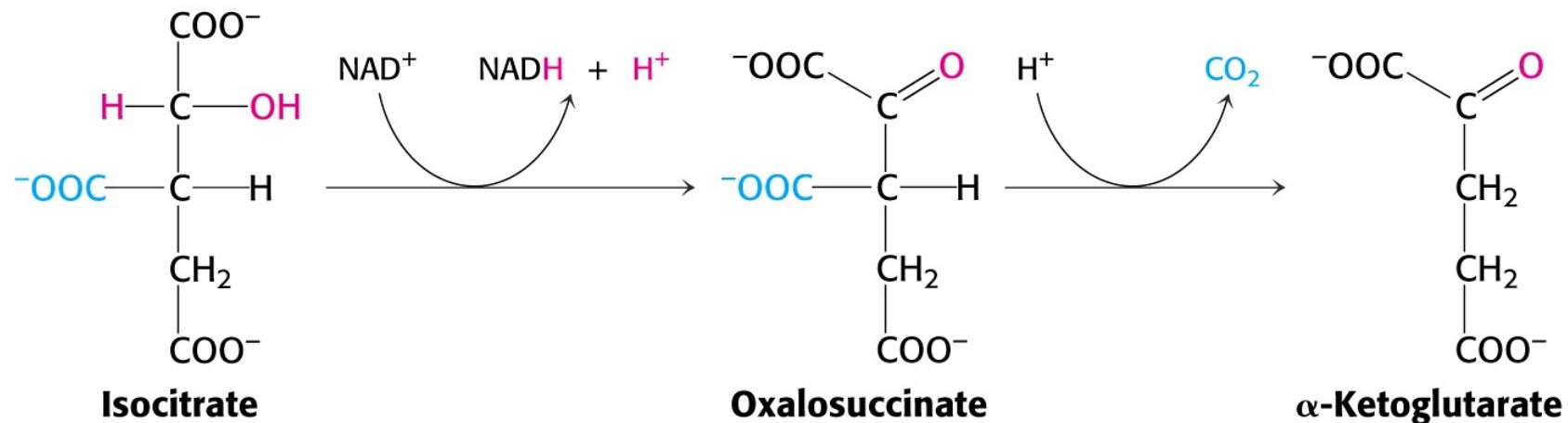
Enzima: **aconitase**  
Proteína com centro de  
4Fe-4S

Mecanismo:  
Desidratação seguida de  
hidratação.  
Ligaçāo do substrato em 2  
pontos. **(carbono proquiral)**



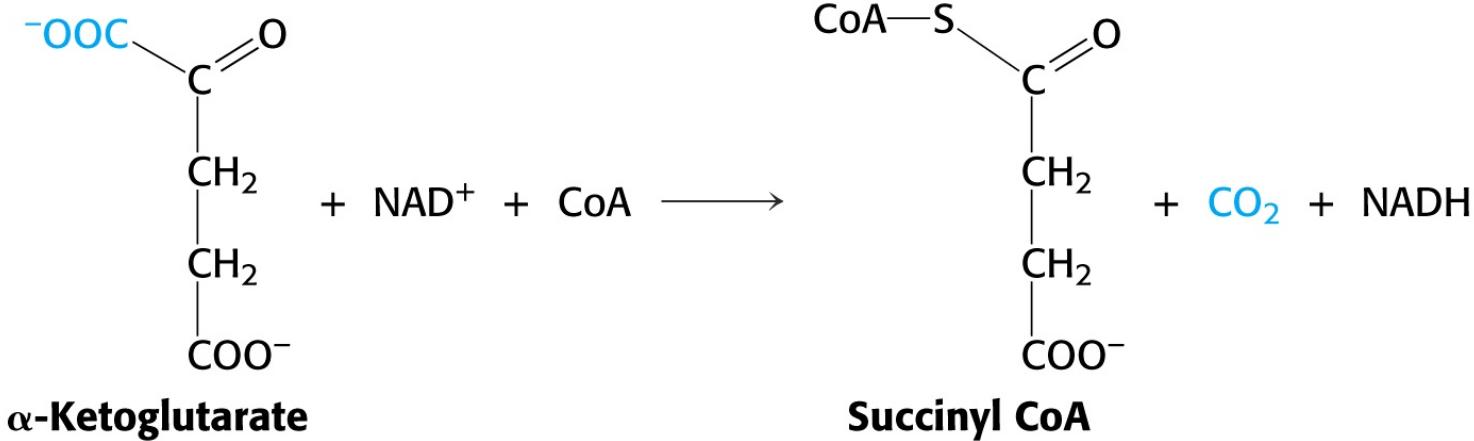
# Descarboxilação oxidativa do isocitrato

Enzima: **isocitrato desidrogenase**

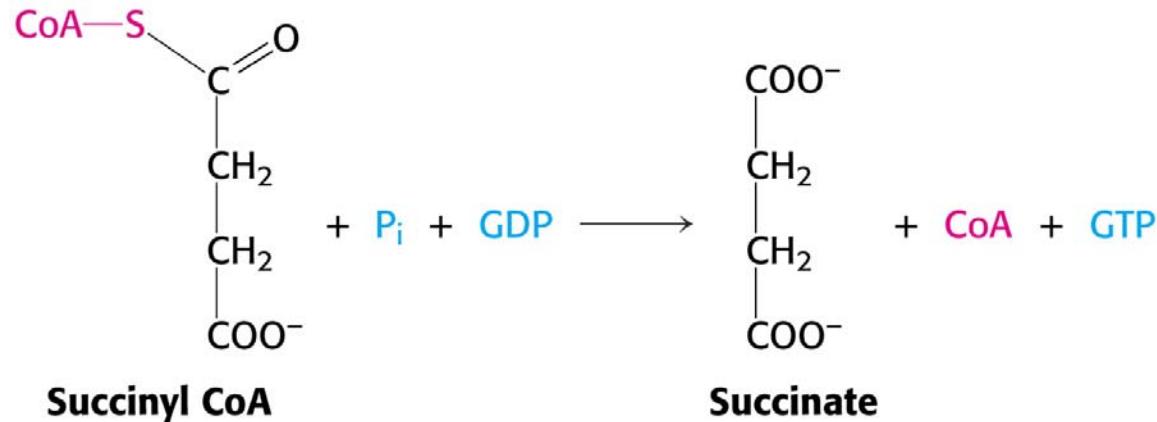


# Descarboxilação oxidativa do α-cetoglutarato

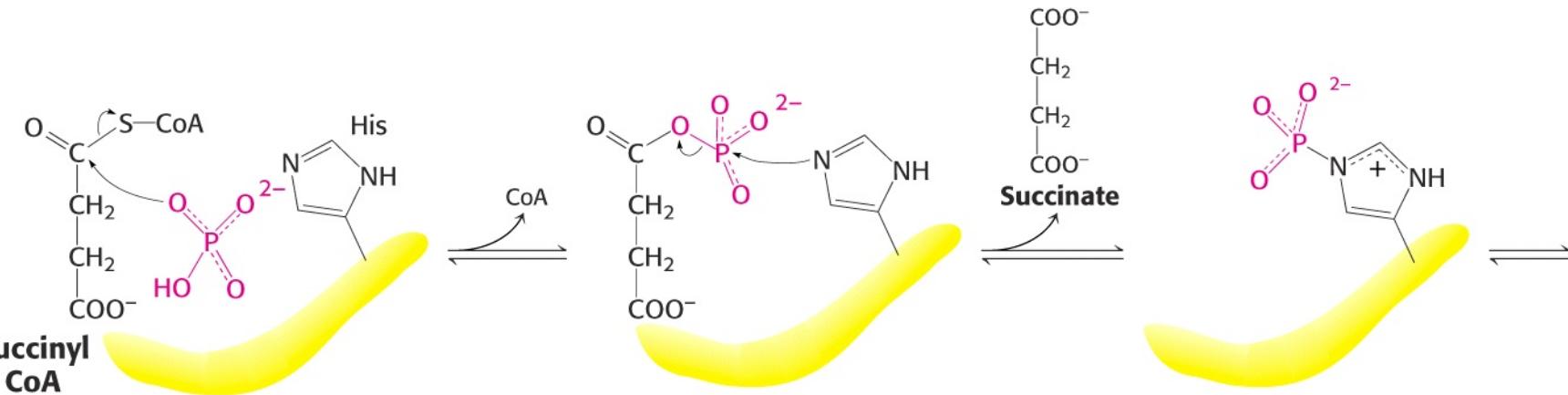
Enzima: **complexo α-cetoglutarato desidrogenase** (semelhante ao complexo piruvato desidrogenase)



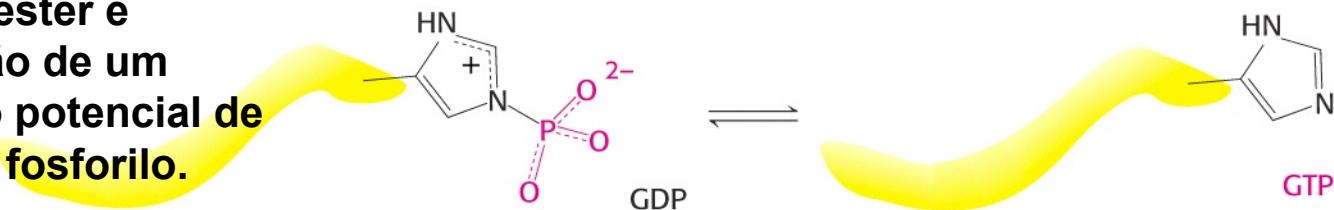
# Hidrólise da ligação tioéster com fosforilação de GTP



Fosforilação a nível do substrato  
Enzima: succinilCoA sintetase

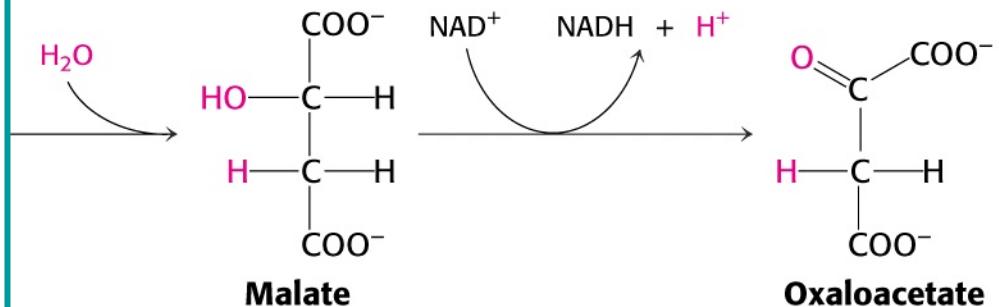
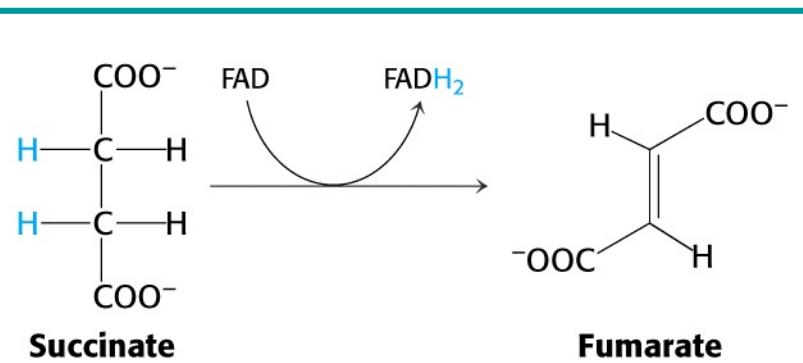


A reacção envolve um intermediário da enzima fosforilado. A energia da hidrólise da ligação tioéster é conservada na formação de um composto com elevado potencial de transferência do grupo fosforilo.



# Regeneração do oxaloacetato em 3 passos: Oxidação, hidratação, oxidação.

Este motivo metabólico é também encontrado na síntese e degradação dos ácidos gordos e na degradação de alguns aminoácidos.



**Enzima:**  
**succinato desidrogenase**

O cofactor FAD está covalentemente ligado a uma His.

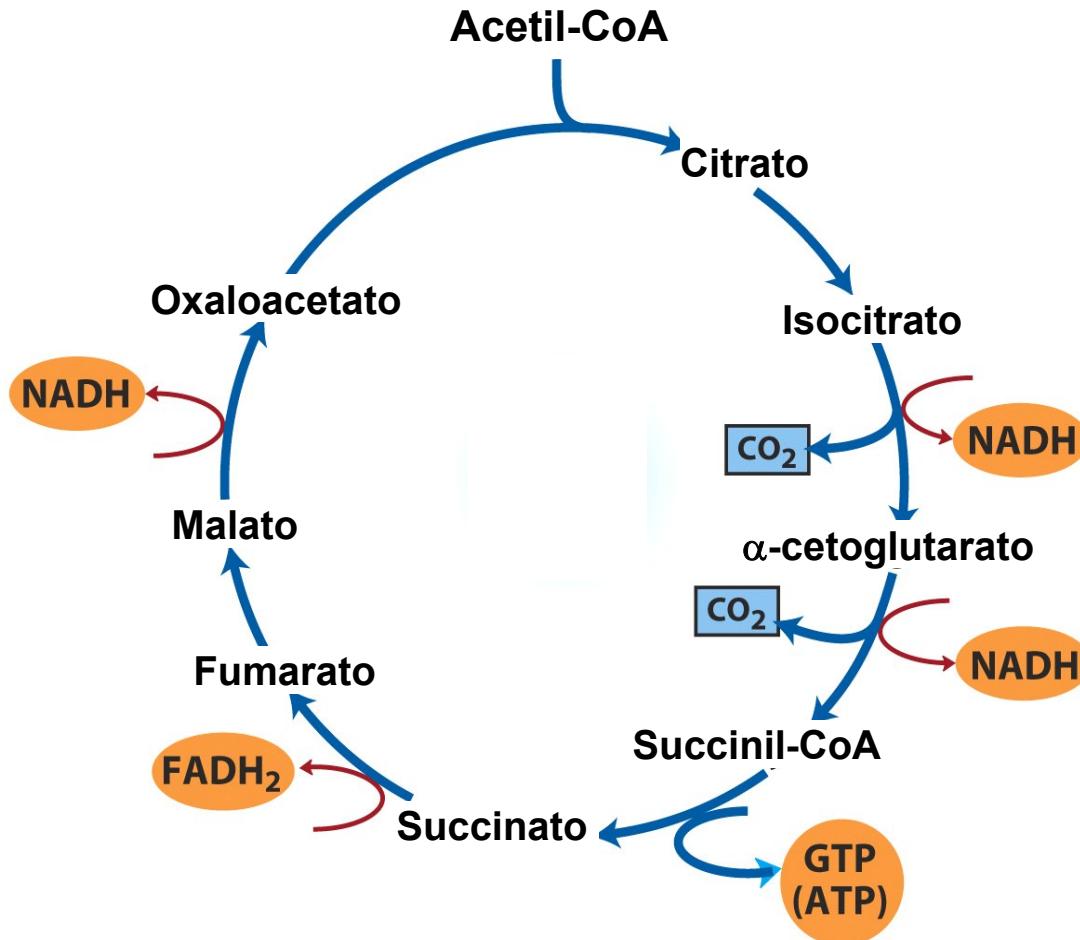
A succinato desidrogenase está inserida na membrana da mitocôndria e está directamente associada à cadeia de transporte de electrões (complexo II).

Contém centros de ferro-enxofre:  
2Fe-2S, 3Fe-4S e 4Fe-4S.

**Enzima: fumarase**  
Cataliza a adição de  $\text{H}_2\text{O}$  à dupla ligação.

**Enzima: malato desidrogenase**  
Cataliza a oxidação do malato a oxaloacetato, numa reacção em que o  $\text{NAD}^+$  é aceitador dos electrões. Esta reacção tem  $\Delta G^{\circ'} > 0$ . Dá-se porque o escoamento do oxaloacetato mantém a sua concentração baixa dentro da mitocôndria.

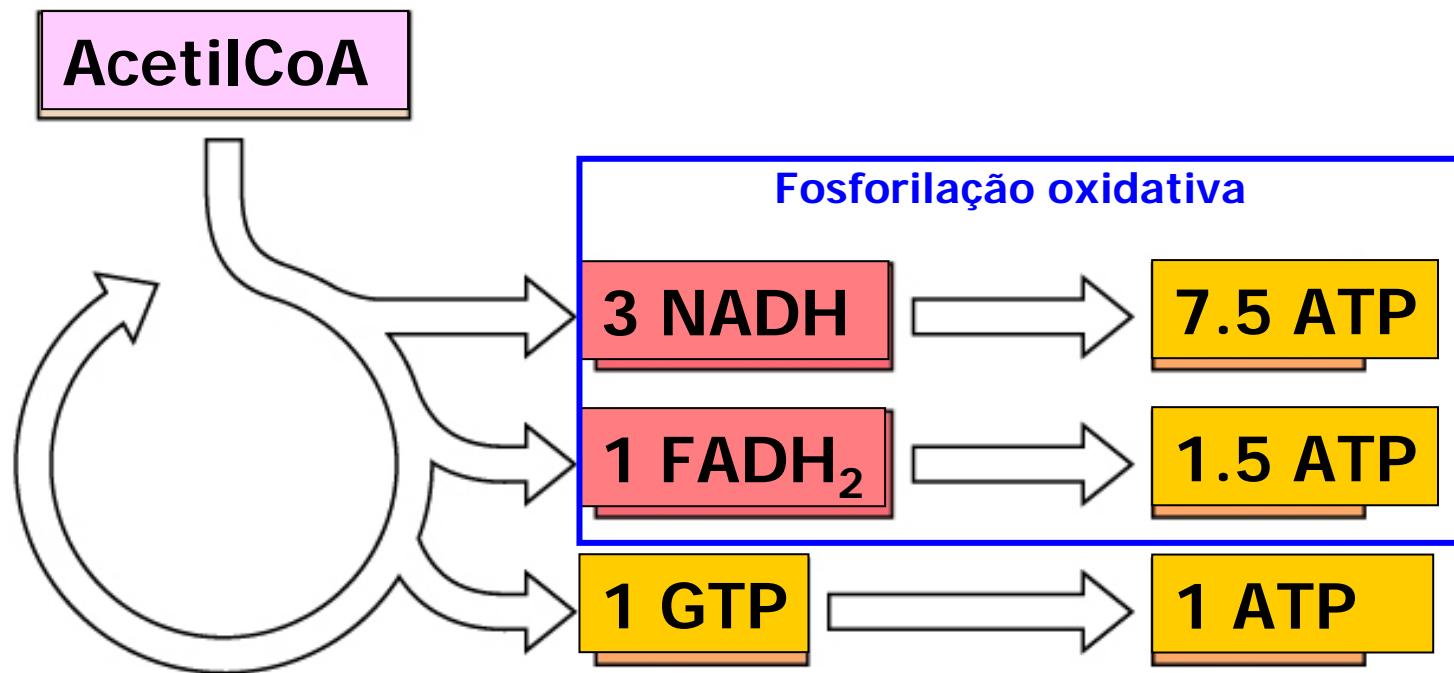
# Balânco global do ciclo de Krebs



**A reoxidação dos cofatores reduzidos está acoplada à síntese de ATP por fosforilação oxidativa, na cadeia respiratória.**

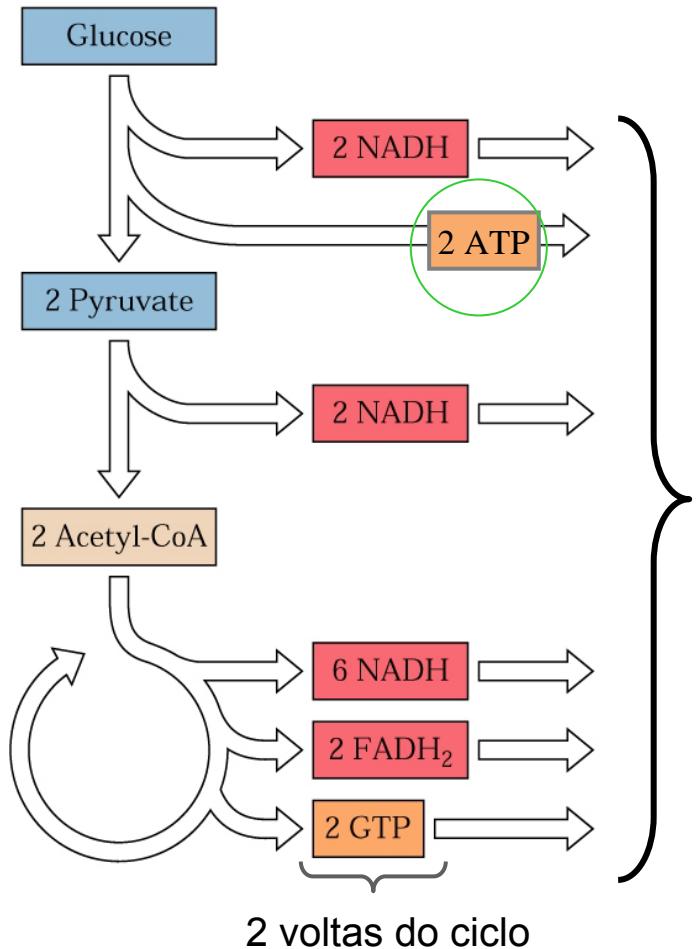


# BALANÇO ENERGÉTICO DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

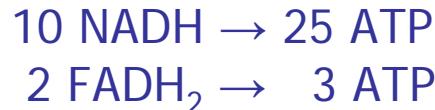


Cada unidade acetato dá origem a 10 ATP

# Glucose → CO<sub>2</sub>: balanço energético



Os cofatores reduzidos **NADH** e **FADH<sub>2</sub>** são reoxidados na cadeia respiratória e a energia é aproveitada para formar ATP por fosforilação oxidativa:

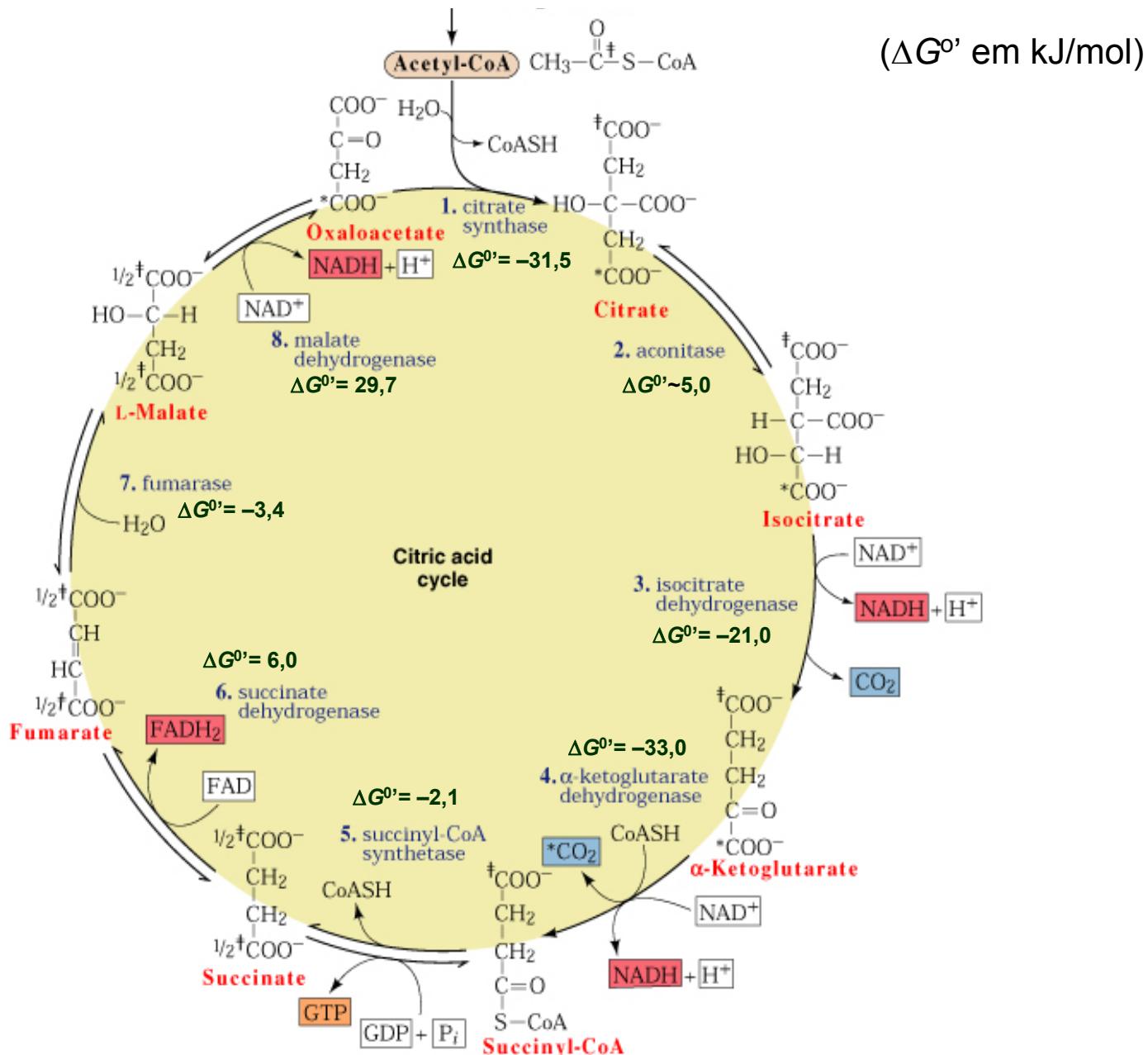


Balanço energético global (1 glucose → CO<sub>2</sub>)  
28 ATP (fosforilação oxidativa)  
4 ATP (fosforilação a nível do substrato)

**Formam-se 32 ATP em resultado da oxidação completa da glucose na presença de oxigénio.**

(Fermentação em condições anaeróbias  
1 glucose → 2 ATP)

# Valores de $\Delta G^{\circ}$ de cada reacção



# O ciclo do ácido cítrico é controlado nas reacções irreversíveis

## Isocitrato desidrogenase

Activação alostérica por ADP, inibição por NADH e ATP

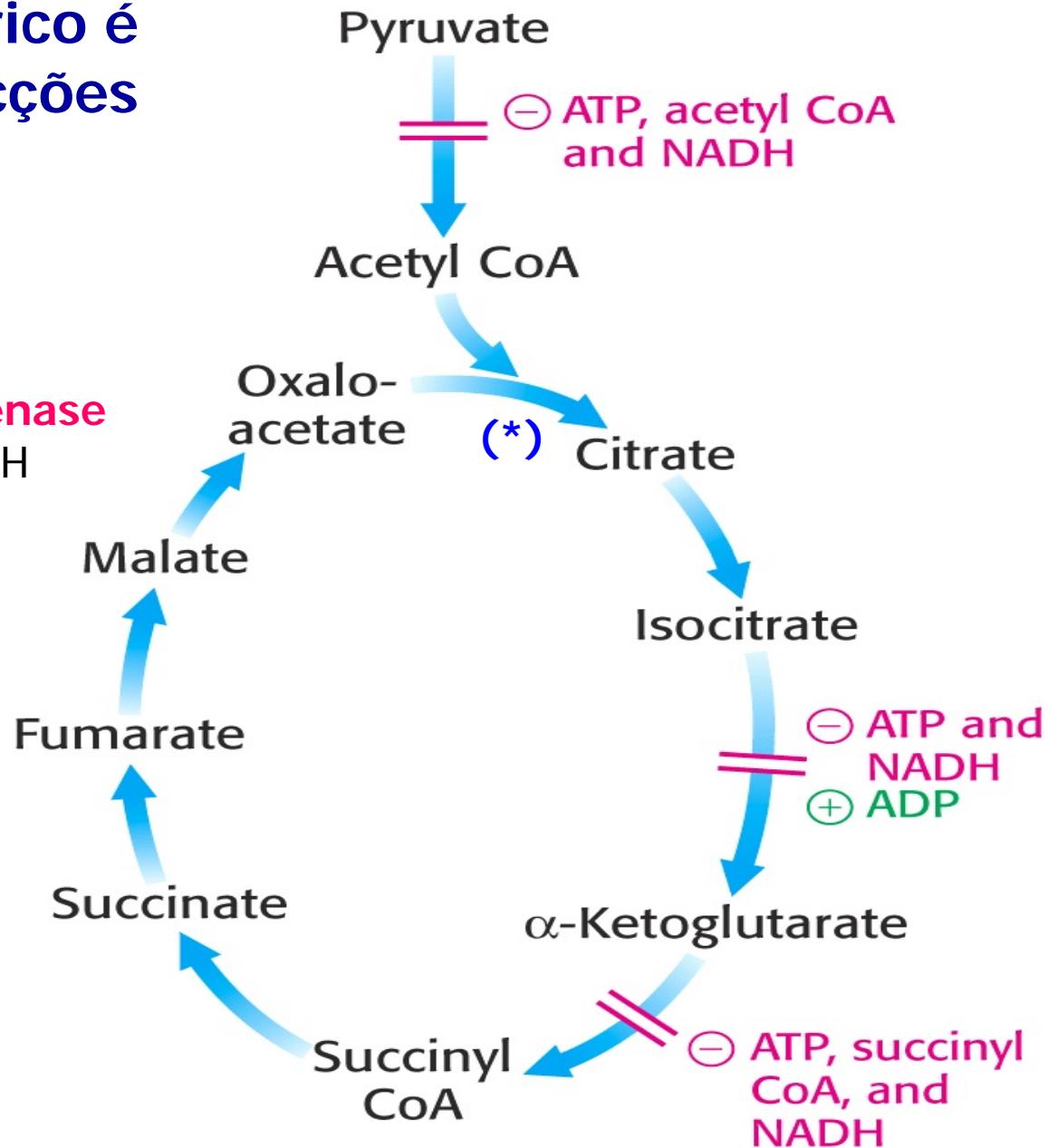
## $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase

Inibição por succinilCoA, NADH e ATP

(\*) Em muitas bactérias a entrada no ciclo também é controlada:

## Citrato sintase

Inibição alostérica por ATP (aumenta  $K_m$  para Acetyl CoA).



Em condições normais *as velocidades da glicólise e do ciclo do ácido cítrico estão coordenadas* pelos níveis de ATP e NADH que são componentes comuns aos dois caminhos e também pela concentração de citrato que é um inibidor da fosfofrutocinase (enzima que cataliza o primeiro passo irreversível exclusivo da glicólise).

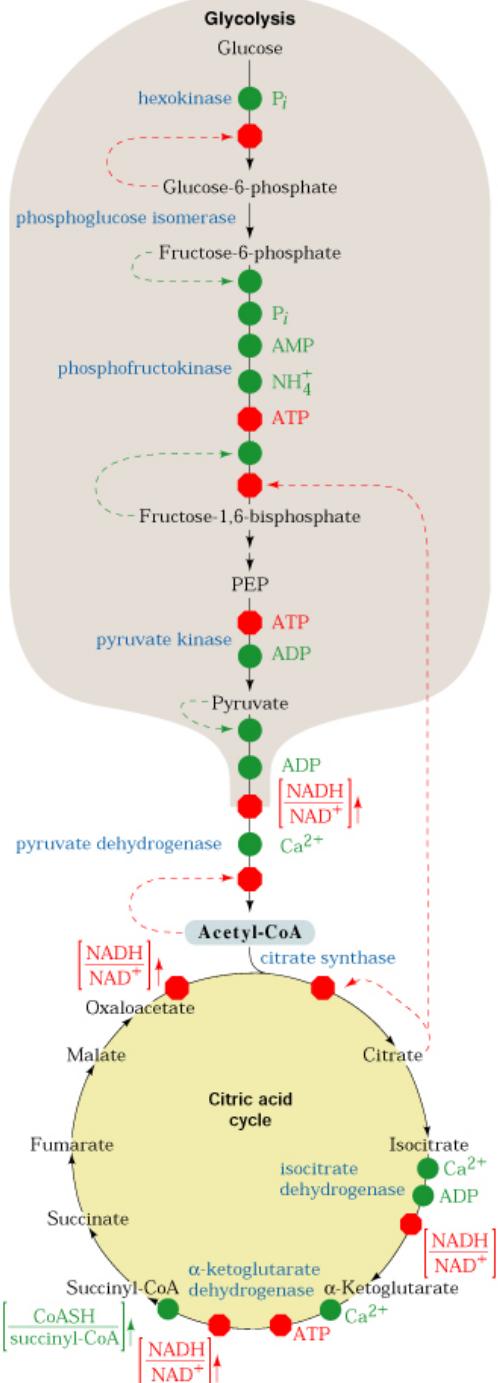
# Regulação coordenada da glicólise e do ciclo do ácido cítrico

[ATP] : [ADP]

Se a célula tiver muita energia a glicólise e o ciclo de Krebs são inibidos, se tiver pouca energia estas vias metabólicas são activadas.

[NADH] / [NAD<sup>+</sup>]

Se a razão [NADH] / [NAD<sup>+</sup>] for elevada significa que a reoxidação dos cofactores na cadeia respiratória está a ser limitante e vão faltar os cofactores oxidados necessários para as reacções do ciclo de Krebs. É inibida a reacção de entrada no ciclo e as reacções do ciclo que envolvem NAD<sup>+</sup>.



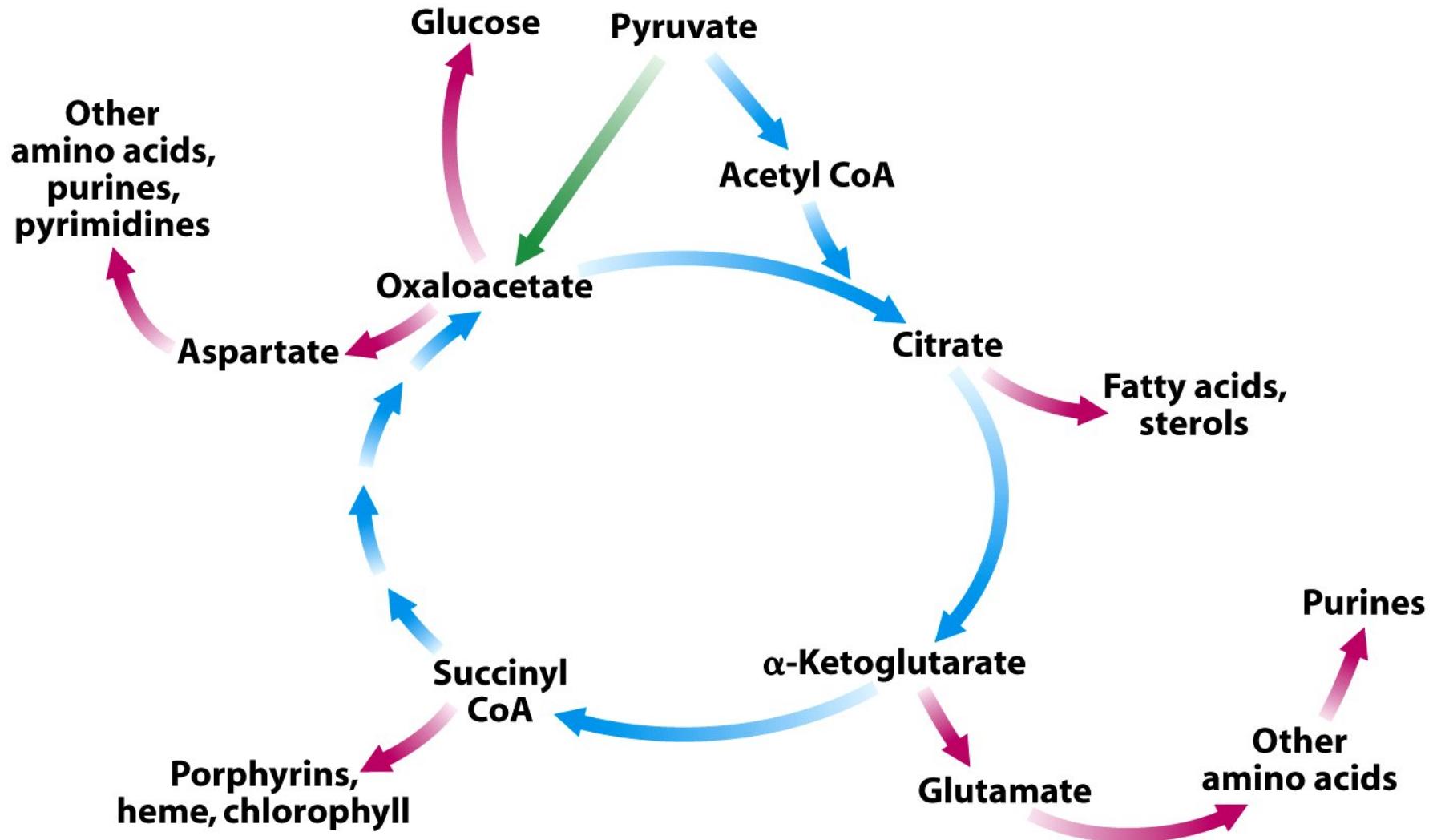
Regulação pela concentração de citrato

(-) glicólise

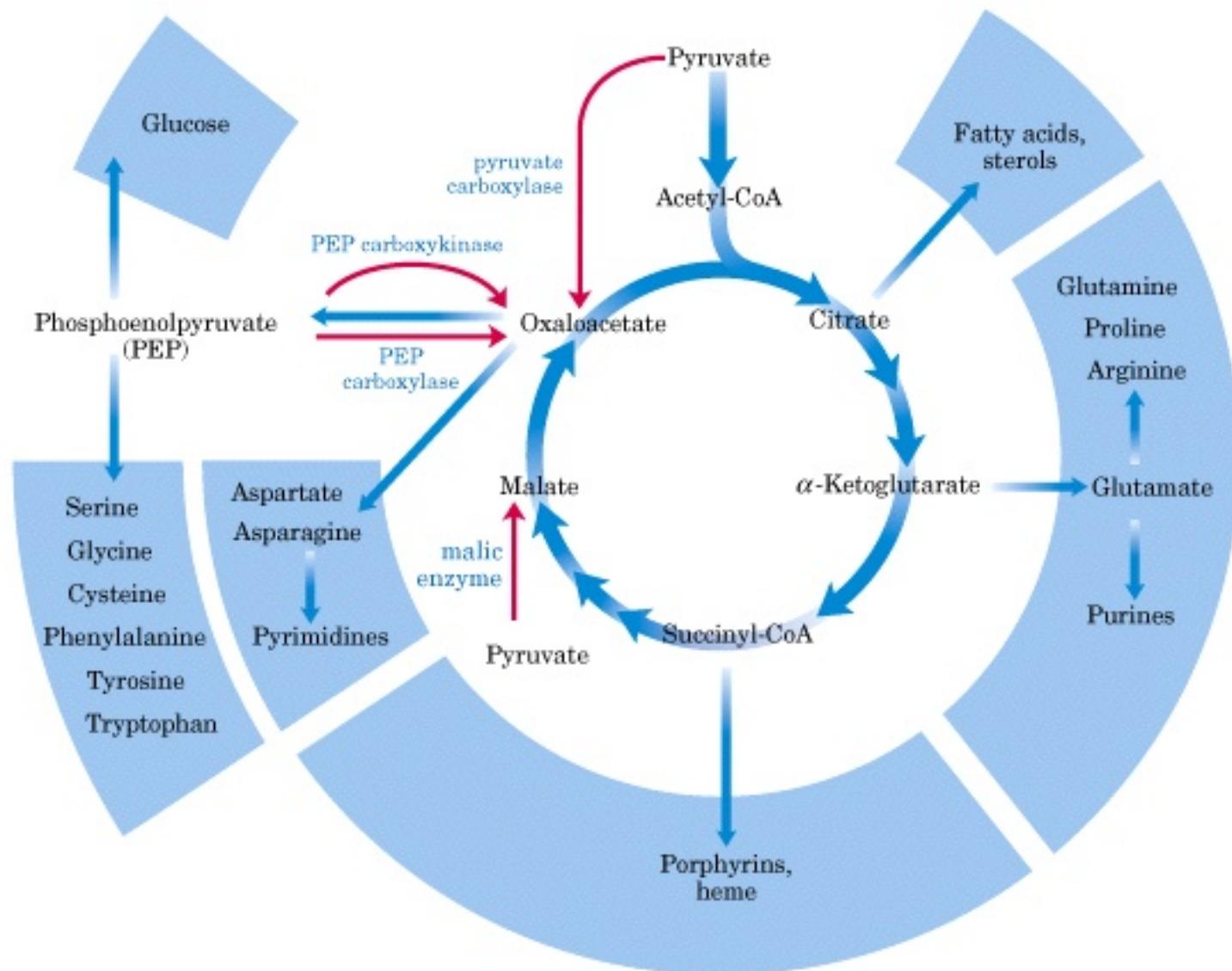
(+) gluconeogénese

Quando o ciclo de Krebs é inibido há acumulação de citrato, que vai inibir a glicólise e estimular a gluconeogénese.

# Carácter anfibólico do ciclo de Krebs: o ciclo também fornece intermediários para a biossíntese.



# Reacções anapleróticas: os intermediários do ciclo que são gastos na biossíntese têm que ser repostos.



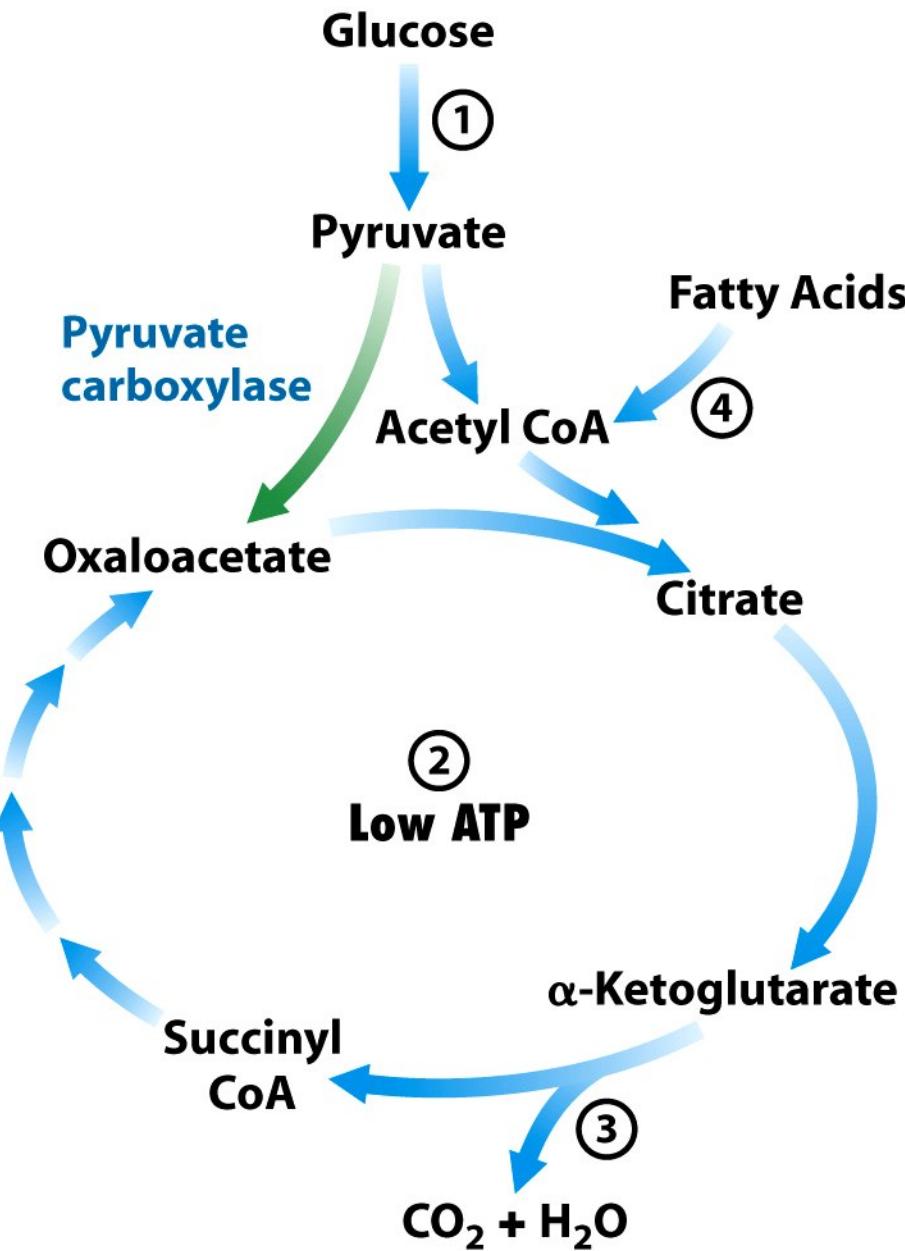
# Reacções anapleróticas

## Anaplerotic Reactions

Reaction	Tissue(s)/organism(s)
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightarrow{\text{pyruvate carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i$	Liver, kidney 
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \xrightarrow{\text{PEP carboxykinase}} \text{oxaloacetate} + \text{GTP}$	Heart, skeletal muscle
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{\text{PEP carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{P}_i$	Higher plants, yeast, bacteria
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightarrow{\text{malic enzyme}} \text{malate} + \text{NAD(P)}^+$	Widely distributed in eukaryotes and prokaryotes

Nota.

A reacção de carboxilação do piruvato catalisada pela enzima piruvato carboxilase constitui o primeiro passo da gluconeogénese que, como vimos, ocorre no interior da mitocôndria. Na gluconeogénese o oxaloacetato é convertido em malato (reacção do ciclo) que é transportado para o citosol onde vão ocorrer os restantes passos desta via metabólica.



Caminhos metabólicos activos quando se inicia o exercício depois de uma noite de sono

O aumento de actividade do ciclo requer acetil-CoA e oxaloacetato

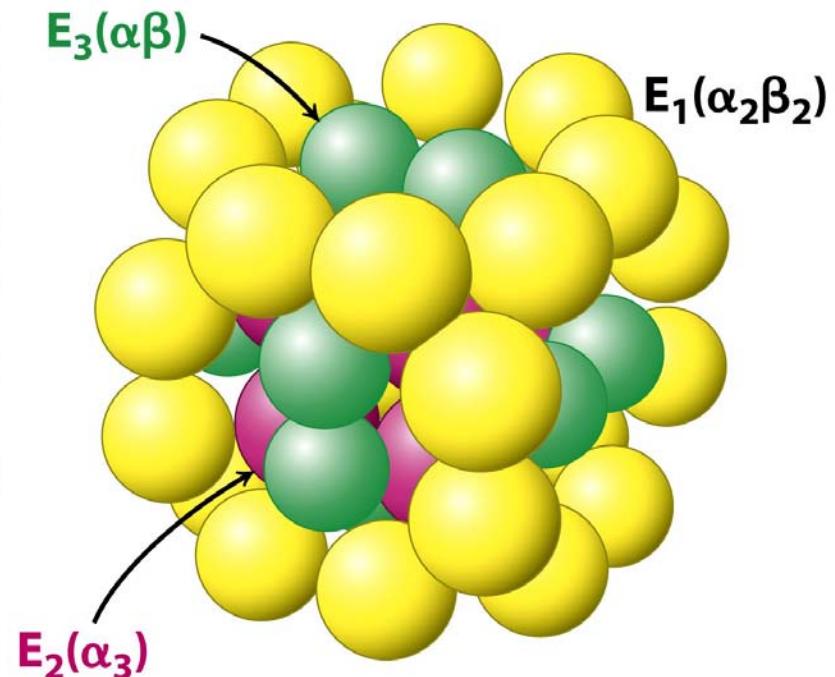
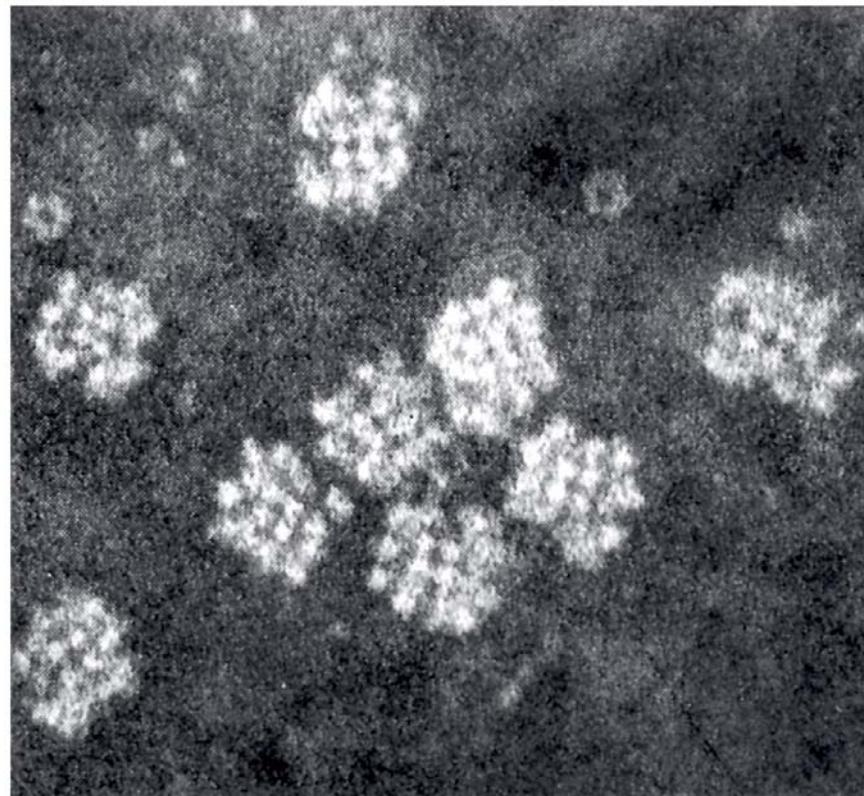
### Active pathways

- ① Glycolysis, Ch. 16
- ② Citric acid cycle, Ch. 17
- ③ Oxidative phosphorylation, Ch. 18
- ④ Fatty acid oxidation, Ch. 22

# **Anexo**

# Reacções envolvidas na descarboxilação oxidativa do piruvato a Acetil-CoA

Reacções catalisadas pelo complexo piruvato desidrogenase que tem 3 enzimas e 3 cofactores: TPP, lipoamida, FAD

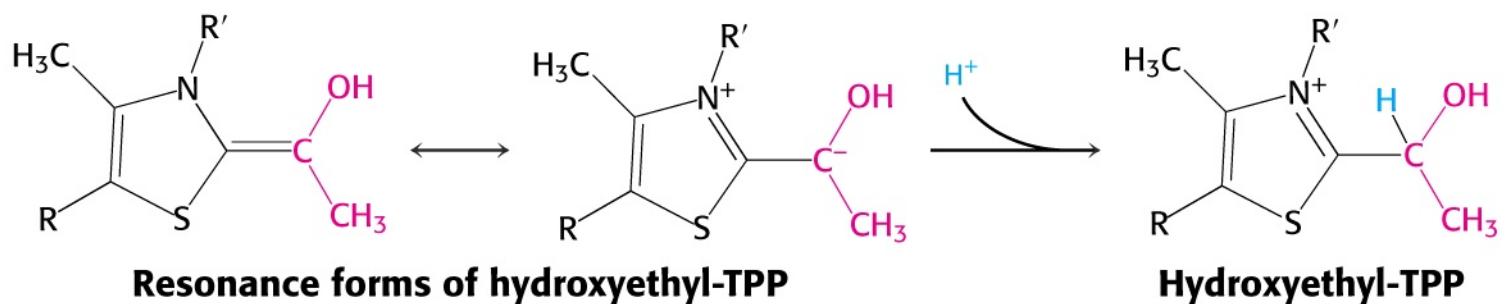
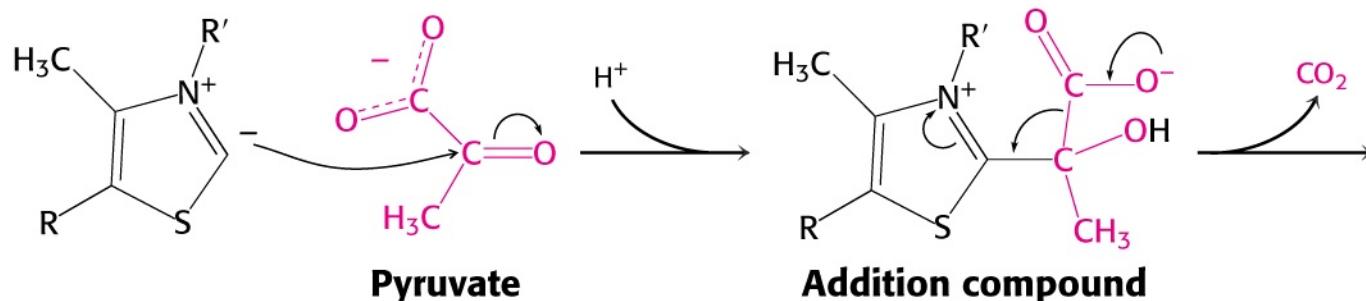


$E_1$  piruvato desidrogenase (TPP)  
 $E_2$  dihidrolipoil transacetilase (lipoamida)  
 $E_3$  dihidrolipoil desidrogenase (FAD)

Enzimas envolvidas:

$E_1$  : piruvato desidrogenase (TPP)

Ligaçāo covalente do piruvato ao TPP seguida de descarboxilação.

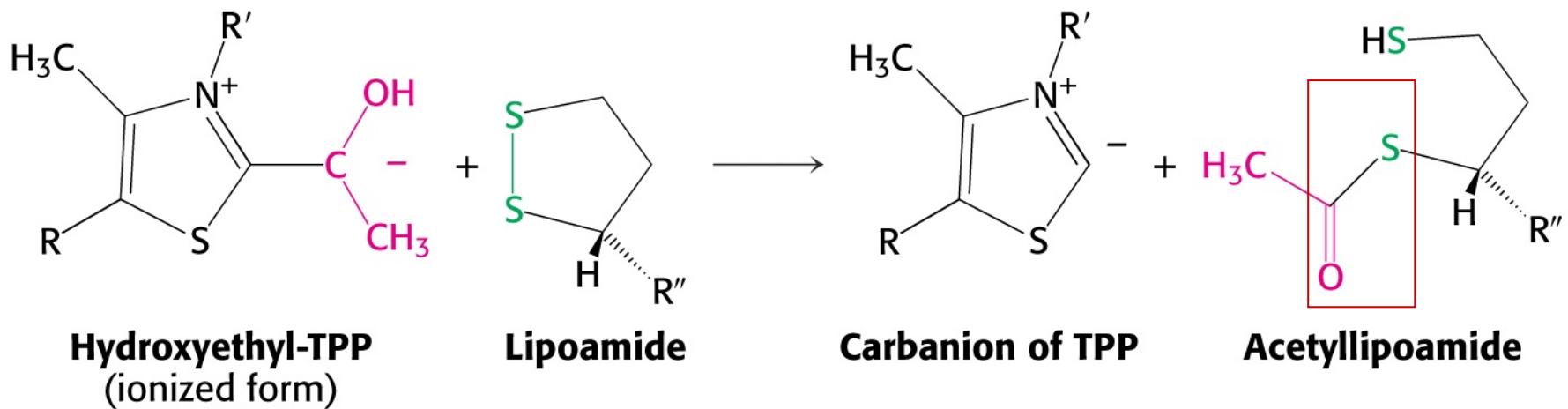


Enzimas envolvidas:

$E_1$  : piruvato desidrogenase (TPP)

$E_2$  : dihidrolipoil transacetilase (lipoamida)

**Oxidação do hidroxietil a acetil. Os electrões e o grupo acetil são transferidos para a lipoamida.**

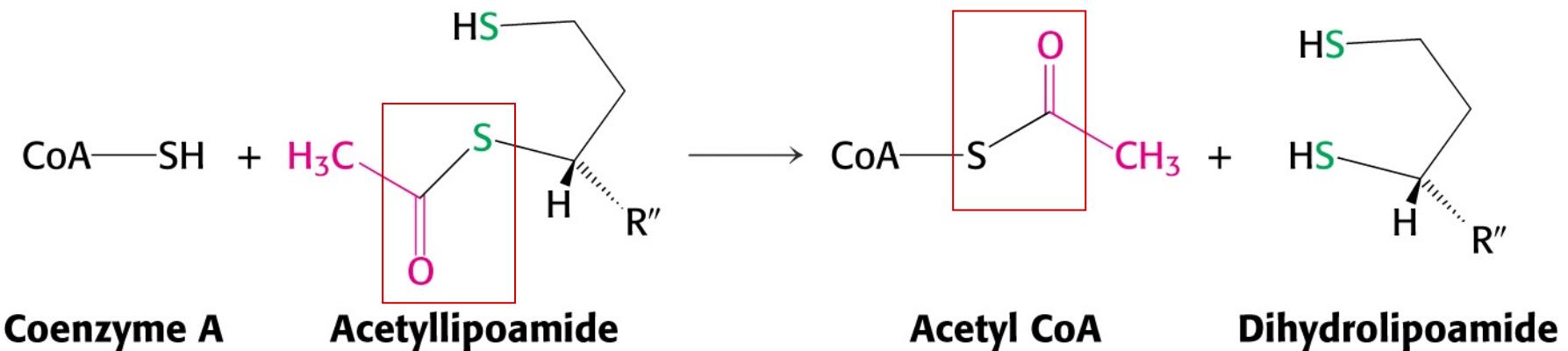


A energia libertada na oxidação é conservada na ligação tioéster da acetil-lipoamida

Enzimas envolvidas:

$E_2$  : dihidrolipoil transacetilase (lipoamida)

O grupo acetil é transferido da lipoamida para a coenzima A.  
A lipoamida fica reduzida.



A energia da ligação tioéster é conservada no Acetil-CoA!

Enzimas envolvidas:

$E_2$  : dihidrolipoil transacetilase (lipoamida)

$E_3$  : dihidrolipoil desidrogenase (FAD)

**Reoxidação da dihidrolipoamida para regeneração da enzima.**

**Os 2 electrões são transferidos para o FAD (grupo prostético da enzima  $E_3$ ) e posteriormente para o  $\text{NAD}^+$  que é reduzido a NADH e libertado.**

