

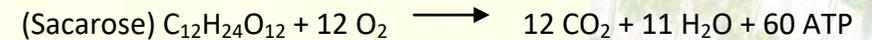
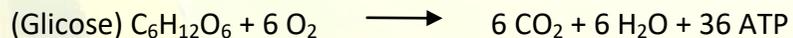
1. RESPIRAÇÃO:

A respiração consiste em um processo fisiológico no qual diferentes compostos orgânicos reduzidos (substratos) são mobilizados e, posteriormente, oxidados de maneira controlada. Durante o processo, a energia livre produzida/liberada é transformada em moléculas de ATP, que é a principal coenzima celular armazenadora de energia. As moléculas de ATP produzidas são utilizadas para a manutenção e/ou para o crescimento dos organismos.

Os principais substratos respiratórios que são oxidados durante a respiração são os carboidratos (açúcares solúveis ou não-solúveis), os lipídios (gordura e óleos) e as proteínas. Todavia, os substratos imediatos da respiração são os açúcares solúveis (glicose, frutose, sacarose, gliceraldeído-3-fosfato, dihidroxiacetona-fosfato, etc), sendo que os demais substratos (amido, lcaloid e proteínas) devem ser quebrados e/ou transformados em açúcares solúveis para poderem atuar como substratos da respiração. Em plantas essas substâncias são produzidas direta ou indiretamente pela fotossíntese, processo fisiológico que fornece diferentes “combustíveis” para a respiração (inicialmente trioses, como o *gliceraldeído-3-fosfato* (3PGAlD) e, a *dihidroxi-acetona-fosfato* (DHAP)), não havendo a necessidade da produção da glicose ou de sacarose para que o processo inicie. A respiração é um processo que consome cerca de 50% dos produtos (açúcares) diários da fotossíntese.

A respiração aeróbia apresenta o oxigênio (O₂) como agente para a oxidação dos substratos. Os principais subprodutos desse processo são o dióxido de carbono (CO₂) e a água (H₂O). A glicose (monossacarídeo) utilizada na respiração é obtida, principalmente, a partir da hidrólise de moléculas de sacarose (dissacarídeo) ou de polissacarídeos de reserva (amido). Para plantas, todavia, a sacarose tem sido considerada, recentemente, como o principal substrato da respiração.

As equações, a seguir, apresentam um resumo dos processos de respiração aeróbia tendo como substratos a glicose ou a sacarose:



Na oxidação da glicose ou da sacarose, as suas moléculas são quebradas, sendo os átomos de hidrogênio removidos e, posteriormente, combinados com o oxigênio que, por sua vez, é reduzido à água. No processo, os elétrons vão de níveis mais altos de energia para níveis mais baixos, liberando assim energia para a produção de ATP.

Além da respiração aeróbia, cujo rendimento energético é maior, a respiração celular também pode ocorrer em ausência de oxigênio, embora esse processo apresente um rendimento energético (produção de ATP) bastante reduzido. Os motivos dessa diferença e as suas peculiaridades serão discutidos mais adiante.

Respiração Aeróbia:

A respiração aeróbia é um dos ciclos mais importantes do metabolismo primário. Ela envolve três etapas distintas: A glicólise, o Ciclo de Krebs e a Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE).

Glicólise:

A primeira etapa do processo respiratório é a glicólise. A glicólise é um processo oxidativo, tipicamente citoplasmático (e cloroplastídico), que não depende diretamente do oxigênio. A glicólise corresponde a cerca de 80% da respiração citossólica, sendo os 20% restantes complementados pela **Rota das Pentoses Fosfato (RPF)**.

Os substratos da glicólise, com diferentes origens, são canalizados para a produção de trioses fosfato (açúcares de três carbonos bastante simples). Para cada molécula de sacarose que é metabolizada, quatro moléculas de trioses fosfato (*gliceraldeído-3-fosfato* = 3PGAlD) são formadas. Todavia, esse processo requer a adição de até 4 moléculas de ATP. Quando o substrato é a glicose, os rendimentos, em termos de trioses e de consumo de ATP, caem pela metade. Nessa primeira fase do processo, portanto, não há produção de ATP e sim o seu consumo. Essa etapa

termina com a produção de 2 moléculas de **3PGald** por molécula de glicose oxidada.

A partir desse ponto, tem início a fase de conservação de energia da glicólise, onde as duas moléculas de **3PGald** produzidas são convertidas, em uma seqüência de reações, em duas moléculas de **piruvato**, principal substrato do Ciclo de Krebs, que se processa na matriz mitocondrial. Paralelamente, para cada molécula de 3PGald oxidada, 2 moléculas de ATP são produzidas, o que resulta em um rendimento final de 4 moléculas de ATP por molécula de glicose oxidada. Ao mesmo tempo, são formadas 2 moléculas de **NADH**, um cofator reduzido e envolvido na bioenergética da respiração como agente redutor na CTE. O rendimento líquido, em termos de ATP, é de 2 moléculas formadas por molécula de glicose oxidada. A produção de ATP na glicólise é denominada *fosforilação ao nível de substrato*, uma vez que o processo ocorre por meio da transferência enzimática de um grupo fosfato, retirado de um intermediário metabólico, para o ADP, o que difere da *fosforilação oxidativa*, que envolve o funcionamento de Cadeias de Transporte de Elétrons.

Além do piruvato, outro produto importante é formado durante o funcionamento da glicólise. Essa molécula é o *fosfoenol-piruvato* (PEP), cuja produção é de duas unidades por molécula de glicose oxidada. O PEP pode ser convertido em oxalacetato que, posteriormente, é convertido em malato. O malato pode ser transportado para a matriz mitocondrial, onde funciona como um substrato alternativo e/ou complementar ao piruvato no Ciclo de Krebs. Além dessa função, o PEP, juntamente com a *eritrose-4-fosfato* (Eritrose-4P), uma molécula produzida na Rota das Pentoses Fosfato, são considerados as substâncias precursoras da biossíntese das substâncias do metabolismo secundário, como da lignina e dos lcaloides, por exemplo.

Ao término da glicólise os produtos formados podem apresentar diferentes destinos, o que é influenciado pelas necessidades metabólicas e, principalmente, pela presença ou não de oxigênio (O₂) no meio. Na nossa atmosfera a concentração de O₂ encontra-se próxima a 21%. Todavia, nos ambientes aquáticos e no solo, essa concentração é menor. Quando a concentração de oxigênio fica abaixo de 2% (hipoxia) ou cai a 0% (anoxia), o

processo respiratório normal, envolvendo o Ciclo de Krebs e a CTE é interrompido, passando a respiração a ser restrita à glicólise, resultando no metabolismo fermentativo.

A fermentação (respiração anaeróbia) é um mecanismo pouco eficiente para as plantas, uma vez que o número de moléculas de ATP produzidas por molécula de glicose oxidada cai de 36 para apenas 2. Além disso, o processo gera substâncias tóxicas para o metabolismo celular, o que acaba causando senescência e morte dos tecidos afetados em indivíduos não adaptados aos ambientes com baixas tensões ou ausência de oxigênio. No processo fermentativo, as duas moléculas de piruvato formadas são convertidas em lactato (fermentação láctica) ou em acetaldeído, sendo esse convertido em etanol (fermentação alcoólica). Em plantas a fermentação alcoólica é mais comum que a láctica. Tanto o lactato quanto o etanol são tóxicos às células, devendo ser rapidamente “varridos” do metabolismo para não causar danos.

Em decorrência disso, quais seriam os motivos para as plantas lançarem mão de um metabolismo que causa danos celulares e que poderia levá-las à morte? Além disso, quais seriam as condições em que as plantas são submetidas às condições de hipoxia ou de anoxia em ambiente natural? As respostas para esses questionamentos são interessantes. Ao observarmos a fase de conservação de energia da glicólise, podemos verificar que a produção de moléculas de ATP ocorre paralelamente à produção de moléculas de piruvato e de NADH. Todavia, sem O₂ no meio, o piruvato não é transferido para a mitocôndria, local onde as 34 moléculas restantes de ATP são produzidas, associadas ao funcionamento do Ciclo de Krebs e, principalmente, da CTE. Portanto, a glicólise fermentativa é a única alternativa restante para a manutenção da produção de ATP, que ocorrerá, todavia, com um rendimento extremamente baixo e com a produção de uma substância tóxica. Essa alternativa, contudo, torna-se necessária para que moléculas de NAD⁺ sejam produzidas, uma vez que a reação catalisada pela enzima *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* utiliza esse cofator. Se observarmos,

durante a fermentação alcoólica e láctica, moléculas de NADH são oxidadas (perdem e⁻) originando moléculas de NAD⁺, que permitem a manutenção da respiração glicolítica (fermentativa). Portanto, a resposta para a primeira parte do questionamento é explicada pela necessidade de produção de moléculas de NAD⁺ (NAD na forma oxidada), sendo a fermentação a alternativa bioquímica para que essa reação ocorra em condições de anoxia. Devemos ressaltar que, como veremos a seguir, em condições normais de oxigênio, as moléculas de NAD⁺ necessárias à reação enzimática da *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* são formadas pela oxidação das moléculas de NADH (produzidas na glicólise) na face externa da membrana interna das mitocôndrias, durante o processo de funcionamento da CTE, o que elimina a necessidade da fermentação e os seus inconvenientes metabólicos. Portanto, a fermentação para as plantas é um processo apenas paliativo, de baixo rendimento energético e que somente funciona em prazo de exposição curto em função da sua toxidez.

Quais seriam, então, as condições ou situações para a ocorrência de anoxia ou de hipoxia e, conseqüentemente, para a ocorrência de fermentação em plantas? Essas situações, sem dúvida nenhuma, se restringem aos ambientes controlados, como às câmaras frigoríficas (redução da concentração normal de O₂ para conservação de frutos) e, principalmente aos ambientes de “terra-firmes” eventualmente alagados por inundações causadas por chuvas e pela criação de lagos, em hidroelétricas. No primeiro caso, o dano vai depender do tempo de alagamento. Se o tempo de anoxia/hipoxia for reduzido, a planta pode se recuperar. Se for longo a planta acabará morrendo, uma vez que as raízes serão danificadas pelo etanol. No caso dos lagos em usinas hidroelétricas, o resultado final é a morte de todas as espécies, que tipicamente não conseguem desenvolver estruturas para evitar a anoxia/hipoxia, além de não apresentarem enzimas e metabolismo adaptado para eliminação do etanol.

Todavia, algumas espécies vegetais são adaptadas a essas condições, apresentando a formação de aerênquimas, lenticelas e/ou pneumatóforos, estruturas que mantêm a oxigenação nos tecidos mesmo sob condições de alagamento. Além disso, algumas espécies apresentam enzimas que “varrem” o etanol produzido, eliminando os danos celulares. Tipicamente, essas plantas são

nativas das várzeas ou de matas ciliares, ambientes sujeitos às inundações periódicas ou, ainda, são espécies aquáticas flutuantes, como o aguapé e a salvinia ou, ainda, são espécies subaquáticas, incluindo desde as algas até as angiospermas.

Rota das Pentoses Fosfato:

A rota glicolítica não é a única disponível para a oxidação de açúcares em células vegetais. Partilhando metabólitos comuns, a Rota das Pentoses Fosfato (RPF) também pode realizar essa tarefa numa proporção que pode chegar a até 20% do processo. As reações da RPF são catalizadas por enzimas solúveis presentes no citosol e nos plastídios, predominando nesses últimos. Essa rota também tem como principal substrato um açúcar de 6 carbonos, a *glicose-6-fosfato* (glicose-6P). Essa rota tem como principal produto final a NADPH, outro cofator reduzido e envolvido na bioenergética da respiração (atua em reações citossólicas, nos plastídios e na CTE).

A equação abaixo resume o processo de oxidação da glicose-6P envolvendo a participação da RPF.



Portanto, após 6 voltas, o resultado líquido da RPF é a completa oxidação das moléculas de glicose-6P a CO₂ (não é produzido na via glicolítica), com a síntese concomitante de 12 moléculas de NADPH. Além disso, a RPF produz diversos intermediários. A *ribose-5-fosfato* é um precursor da síntese de riboses e de desoxi-riboses, requeridas para a síntese de RNA e DNA, respectivamente. A *eritrose-4-fosfato*, como ressaltamos anteriormente, se combina com o PEP, produzido na glicólise, na reação inicial que produz os compostos fenólicos dos vegetais, incluindo os aminoácidos aromáticos e os precursores da lignina, dos flavonóides e das fitoalexinas, por exemplo.

Ciclo de Krebs:

Na glicólise pela via aeróbia, a oxidação da glicose ($C_6H_{12}O_6$) é incompleta, resultando na produção de moléculas de NADH, ATP e do *piruvato* ($C_3H_4O_3$), uma molécula ainda reduzida e que apresenta grande quantidade de energia livre em suas ligações químicas. A oxidação completa da glicose envolve a transferência do piruvato para mitocôndria, onde ocorrem o Ciclo de Krebs e a CTE.

As mitocôndrias são organelas semi-autônomas, que apresentam seu próprio DNA, sua própria síntese de proteínas, suas organelas, como os ribossomos (70S), por exemplo, e duas unidades de membranas, que promovem a separação do citossol da sua matriz fluida. Essas duas estruturas, ribossomos 70S e dupla membrana, são características que direcionam a explicação da origem das mitocôndrias para a teoria da endossimbiose, onde as mitocôndrias teriam se originado de bactérias (procariotos tipicamente apresentam ribossomos 70S enquanto eucariotos têm 80S) fagocitadas por células de eucariotos, daí a dupla membrana. Essas membranas apresentam permeabilidade diferencial, sendo a externa pouco seletiva, enquanto a interna é bastante seletiva. Entre ambas forma-se um ambiente denominado *espaço inter-membranas*, extremamente importante para a síntese de ATP na *fosforilação oxidativa*, decorrente do funcionamento da CTE, como veremos mais a frente.

Na respiração aeróbia o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria num processo de troca (antiporte envolvendo OH^-) que envolve a participação de uma proteína transportadora localizada na membrana interna das mitocôndrias. Quando o malato proveniente da glicólise serve de substrato, esse é trocado por *Pi*, também num sistema de transporte do tipo antiporte. No interior da mitocôndria, o malato é transformado em piruvato. Todo o piruvato presente na mitocôndria é oxidado em uma série de nove reações conhecidas como *Ciclo de Krebs*, em homenagem ao cientista Alemão Hans A. Krebs, que em 1937 relatou a descoberta do *Ciclo do Ácido Cítrico*, fazendo jus a um Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina no ano de 1953, por esse trabalho. Esse

Ciclo é também conhecido como Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (em função de dois dos componentes do ciclo apresentarem três carboxilas).

A primeira reação de transformação do piruvato em *acetil-CoA* ainda não faz parte do Ciclo. A primeira reação propriamente dita do Ciclo de Krebs é a de transformação do acetil-CoA e do AOA em *cittrato*, que por sua vez é oxidado a *isocitrato*, *2-oxoglutarato*, *succinil-CoA*, *succinato*, *fumarato*, *malato* e finalmente a *oxalacetato*, fechando o Ciclo. A cada molécula de piruvato que entra no ciclo são produzidas três moléculas de CO_2 (local de produção desse gás na respiração aeróbia). Os elétrons liberados nas reações oxidativas são utilizados para reduzir quatro moléculas de NAD^+ a $NADH$ e uma molécula de FAD a $FADH_2$. Em todas as reações onde ocorre a síntese de NADH e na reação de síntese da $FADH_2$ as enzimas envolvidas sempre são *desidrogenases* (*malato desidrogenase*, *succinato desidrogenase*, etc). A $NADH$ é o principal agente redutor relacionado à Cadeia de Transporte de Elétrons. Além dessas substâncias reduzidas, uma molécula de ATP é sintetizada ao nível de substrato na reação catalisada pela enzima *succinil Co-A sintetase*. Como ao final da glicólise são produzidas duas moléculas de piruvato, para a completa oxidação da glicose o Ciclo de Krebs precisa dar duas voltas. Portanto, todos os produtos desse Ciclo são formados em dobro (8 moléculas de CO_2 , 8 moléculas de $NADH$ e 2 moléculas de ATP). Como se percebe, até esse estágio, foram produzidas, em termos líquidos, apenas 4 moléculas de ATP do total esperado de 36 moléculas possíveis com a oxidação completa da glicose. Tal fato indica que o principal mecanismo de produção do ATP envolve o funcionamento da CTE.

Cadeia de Transporte de Elétrons:

Os estudos relacionados ao funcionamento da *Cadeia de Transporte de Elétrons* (CTE) são muito interessantes e envolveram a utilização de inibidores do fluxo de elétrons e de conhecimentos relacionados à biologia celular e molecular. A CTE apresenta diferentes complexos protéicos localizados nas membranas internas das

mitocôndrias. Três desses complexos são formados por proteínas transmembrana, enquanto um deles é formado por uma proteína periférica. Um quinto complexo protéico, também localizado na membrana interna, é o responsável pela síntese de ATP.

O principal substrato da CTE é a NADH. Esse cofator reduzido é oxidado no *Complexo I* (NADH desidrogenase), um complexo enzimático capaz de oxidar a NADH e transferir seus elétrons ao “*Pool de Ubiquinona-UBQ*” um pequeno carregador de prótons e elétrons solúvel em lipídios e localizado no interior da membrana interna. Quatro prótons (H^+) são bombeados para o espaço intermembranas para cada par de elétrons que passa pelo complexo (cada molécula de NADH oxidada libera um par de elétrons). O *Complexo II* (*succinato desidrogenase*) promove a oxidação do *succinato* à *fumarato*, com a produção de *FADH₂*, que por sua vez também doa elétrons ao UBQ. Esse complexo não bombeia prótons para o espaço intermembranas. O *Complexo III* (citocromo *bc₁*) oxida a ubiquinona reduzida (ubiquinol) e transfere elétrons ao citocromo *c*, uma proteína periférica, fracamente presa à membrana interna e que transfere elétrons do Complexo III ao Complexo IV. Quatro prótons (H^+) são bombeados para o espaço intermembranas para cada par de elétrons que passa pelo complexo. O *Complexo IV* (citocromo *c* oxidase; ou oxidase ‘normal’), contém, dentre outros, um citocromo *c* e um citocromo *a₃*. O Complexo IV é a oxidase terminal e realiza a redução do O_2 a duas moléculas de H_2O . Dois prótons (H^+) são bombeados para o espaço intermembranas para cada par de elétrons que passa por esse complexo.

A transferência de elétrons do citocromo *c* para o *a₃* (oxidase normal) é exatamente o ponto onde a CTE dos animais é interrompida pela adição de cianeto, azida ou CO às mitocôndrias, interrompendo todo o fluxo de elétrons e, conseqüentemente, toda a respiração, levando o indivíduo à morte. Todavia, descobriu-se que, ao contrário do que ocorre nas mitocôndrias dos animais, o funcionamento da CTE nas mitocôndrias dos vegetais não é interrompido pela adição de cianeto. Estudos subseqüentes demonstraram que as mitocôndrias vegetais apresentam uma via auxiliar para o fluxo de elétrons, denominada *oxidase alternativa* (AOX), que consegue receber elétrons diretamente do UBQ,

sem passar pelos complexos III e IV, reduzindo o O_2 a duas moléculas de H_2O . Ao contrário do que se poderia pensar, essa via não tem por finalidade específica tornar as mitocôndrias vegetais tolerantes ao cianeto, e sim funções ecológicas, que serão comentadas mais adiante. Além dos quatro complexos protéicos e da AOX, as mitocôndrias vegetais apresentam pelo menos mais quatro proteínas adicionais que atuam transferindo elétrons ao UBQ, aumentando o rendimento do processo respiratório.

O processo de funcionamento da CTE resulta na transferência líquida de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Tal fato resulta na formação de um gradiente de potencial eletroquímico entre esses dois compartimentos. Esse gradiente é utilizado pelas mitocôndrias para a produção de energia (das 32 moléculas de ATP restantes). O cientista Peter Mitchell propôs, em 1961, a *Teoria Quimiosmótica de Mitchell* para explicar como os gradientes de potencial podem ser utilizados para esse fim. Essa teoria foi posteriormente comprovada, dando a Mitchell um Prêmio Nobel. Segundo a Teoria “*a formação de um gradiente de potencial eletroquímico, entre dois compartimentos, separados por uma membrana semipermeável, fornece força motriz que pode ser utilizada para a síntese de ATP*”. Essa teoria apresenta analogia ao funcionamento das usinas hidroelétricas, onde o peso da água armazenada no lago é bombeado, através de um tubo, até as turbinas que, por sua vez, giram produzindo energia cinética que, posteriormente, é transformada em energia luminosa.

Os três complexos protéicos envolvidos no transporte de H^+ para o espaço intermembranas são denominados complexos conservadores de energia. Nas mitocôndrias das plantas e dos animais, a existência do complexo protéico denominado *F₀F₁ATP-sintase* (também denominado *Complexo V*), localizado na membrana interna da mitocôndria permite que os H^+ bombeados para o espaço intermembranas voltem para a matriz mitocondrial através de um tubo existente no interior do complexo. Quando isso acontece o gradiente de potencial eletroquímico é dissipado e

a energia livre liberada possibilita que moléculas de fosfato inorgânico (P_i) sejam incorporadas ao ADP, originando moléculas de ATP. Estudos de bioenergética demonstraram que a cada 3 H^+ que voltam do espaço inter-membranas para a matriz mitocondrial, uma molécula de ATP é produzida ($\Delta G_{H^+} = -5,06$ Kcal/mol; $\Delta G_{3H^+} = -15$ Kcal/mol; a síntese de 1 molécula de ATP exige pelo menos $\Delta G = -11$ a -13 Kcal/mol). Esse processo, por envolver o funcionamento da CTE recebe a denominação de *fosforilação oxidativa*. A produção de ATP e o fluxo de elétrons na CTE são processos *acoplados*, ou seja, interligados. Se o fluxo de elétrons for interrompido, a produção de ATP também é paralisada. Tal fato foi comprovado com a utilização de desacoplantes como o *dinitrofenol* (DNP), por exemplo. Essas substâncias são *ionóforos*, substâncias solúveis na membrana e capazes de se dissociar em ambientes alcalinos, destruindo o gradiente de potencial eletroquímico, impedindo a síntese de ATP. Esse processo impede a produção de ATP mas, em contrapartida, não interrompe o fluxo de elétrons.

Durante a quebra aeróbia da molécula de glicose a CO_2 e H_2O , 36 moléculas de ATP são geradas. Comparativamente ao que foi observado para a fermentação, cujo saldo é de apenas 2 moléculas de ATP por molécula de glicose oxidada, percebemos um rendimento 18 vezes maior para a respiração aeróbia. Tal fato foi observado por Louis Pasteur em seus estudos de microbiologia utilizando espécies de bactérias aeróbias/anaeróbias facultativas. Ele percebeu que quando essas espécies eram cultivadas em ausência de oxigênio, o consumo de glicose era muito maior do que sob condições aeróbias. Tal fato ficou conhecido como "*Efeito Pasteur*". A análise do balanço de rendimento do processo da respiração aeróbia, apresentado a seguir, somente foi possível pelo conhecimento atual das características dos complexos protéicos presentes na membrana interna das mitocôndrias, bem como pela utilização de inibidores do fluxo de elétrons na CTE.

Rendimento da respiração aeróbia (por molécula de glicose):			
Quantidade produzida	Local	Rendimento	Total Parcial
⇒ 2 ATP ao nível de substrato	Glicólise	-	2 ATP
⇒ 2 ATP ao nível de substrato	Ciclo de Krebs	-	2 ATP
⇒ 2 moléculas de NADH	Glicólise	2 ATP x <u>2</u>	4 ATP
⇒ 8 moléculas de NADH	Ciclo de Krebs	8 ATP x <u>3</u>	24 ATP
⇒ 2 moléculas de $FADH_2$	Ciclo de Krebs	2 ATP x <u>2</u>	4 ATP
		Saldo Total	36 ATP

A explicação para o menor rendimento na produção de ATP, quando a NADH é proveniente da glicólise ou quando esta é oriunda do Ciclo de Krebs, está relacionada ao número de complexos protéicos conservadores de energia, ou seja, aqueles que participam do processo de transferência de H^+ para o espaço inter-membranas. No caso da NADH citossólica, apenas os complexos III e IV funcionam, lançando um total de 6 H^+ para o espaço inter-membranas, o que potencialmente permite a geração de apenas 2 moléculas de ATP (lembrando que a cada 3 H^+ que voltam pela ATPsintase, uma molécula de ATP é produzida). Quando a NADH é proveniente do Ciclo de Krebs, todos os complexos protéicos entram em funcionamento, bombeando um total de 10 H^+ para o espaço inter-membranas, o que possibilita um rendimento de até 3 moléculas de ATP.

Esse fato nos permite retornar à discussão a respeito das funções da oxidase alternativa (AOX). Essa via, como ressaltamos, não tem a função principal de evitar a ação tóxica do cianeto sobre oxidase normal. Ela tem função ecológica, atuando basicamente no aumento da temperatura de determinados órgãos ou de toda a planta. O funcionamento dessa via, ao

contrário do esperado, não é estimulado por cianeto (que uma vez interrompendo o fluxo de elétrons na oxidase normal não pode mais ser eliminado) e sim por um análogo do princípio ativo da aspirina (ácido acetil-salicílico), o *ácido salicílico*. O ácido salicílico, recentemente, tem sido associado a diferentes processos fisiológicos em plantas como uma molécula sinalizadora (característica de fitormônio). Em determinadas plantas de clima frio, o desvio do fluxo de elétrons, ativado pelo ácido salicílico nas épocas de inverno, causa o aquecimento da planta como um todo, permitindo a sua sobrevivência nesse ambiente. Esse efeito termogênico é observado de modo mais espetacular, ainda, em plantas da família das Araceae, mais especificamente em uma espécie denominada *Symplocarpus foetidus*. Essas plantas apresentam uma espádice, que na época da polinização, tem a sua temperatura aumentada em até 14°C acima da temperatura ambiente, liberando odores, geralmente ruins, que irão atrair moscas e outros insetos responsáveis por sua polinização. Esse aumento é antecipado por um aumento na concentração de ácido salicílico nos seus tecidos.

Então, como e porque isso ocorre? A explicação para esses fenômenos está exatamente no funcionamento da CTE. Ao desviar o fluxo de elétrons para a AOX, o número de complexos conservadores de energia que atuam cai de 4 para apenas 1. Somente o Complexo I passa a atuar, o que resulta na redução da quantidade de H⁺ transportados para espaço inter-membranas, fazendo com que o consumo de substrato (NADH) se eleve e, principalmente, que a velocidade no fluxo de elétrons aumente visando compensar a redução no transporte de H⁺ e na produção de ATP. O aumento dessa velocidade é responsável pelo aumento na temperatura, conforme ocorre, por exemplo, em nossas casas, quando utilizamos vários equipamentos elétricos ligados em uma única tomada.

O tipo de substrato utilizado para a respiração pode ser identificado pelo que se conhece como *Quociente Respiratório (QR)*, que representa a relação entre a quantidade de CO₂ liberado pela quantidade de O₂ consumido.

Substrato	Reação	QR
Carboidratos (glicose)	$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \longrightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O + 36 ATP$	1,0
Lípidios (ácido oléico)	$C_{18}H_{34}O_2 + 25,5 O_2 \longrightarrow 18 CO_2 + 17 H_2O$	≈ 0,7
Ácidos orgânicos e fermentação		> 1,0

2. SEMENTES: GERMINAÇÃO E DORMÊNCIA:

O início da vida de uma nova planta começa com a germinação das suas sementes. As sementes utilizadas em novos plantios são oriundas de frutos formados em uma estação anterior, o que pode ter ocorrido há pouco tempo ou mesmo há vários anos. As sementes representam a melhor forma de preservação e perpetuação das espécies em diferentes condições ambientais, muitas das vezes em situações em que a planta, após a germinação não sobreviveria. As sementes toleram condições de seca, de fogo, de temperaturas elevadas e de congelamento, dentre outras condições adversas.

As sementes são constituídas, basicamente, pelo *tegumento* (casca), que protege a semente, pelo *endosperma*, que acumula diferentes tipos de reservas e, pelo *embrião*, estrutura responsável pela organização da nova planta após a germinação. O embrião pode ser considerado uma “planta em miniatura” mantida em estado de latência, aguardando as condições ambientais adequadas para a ativação do processo germinativo.

Uma necessidade primordial para o início do processo de germinação é a *embebição* da semente. Esse processo é considerado a primeira etapa da germinação. Nessa etapa, diversas estruturas presentes na semente contribuem para a absorção da água do meio e da atmosfera. Dentre os constituintes das sementes, o que mais contribui para a embebição é o *amido*, armazenado no endosperma, e cujas características e propriedades tornam o processo puramente *físico*. O elevado potencial matricial do amido (potencial de embebição ou adsorção) resulta numa elevada capacidade de absorção de água e, conseqüentemente, na geração de forças de expansão que permitem, por exemplo, a ruptura de pisos de cimento e de asfaltos, possibilitando a germinação e o estabelecimento das plântulas nos mais diferentes substratos. As sementes em estado de *quiescência* (latência) ou mesmo de *dormência* apresentam taxas respiratórias reduzidas, minimizando o consumo das reservas.

Após a embebição, caso a semente não apresente dormência, a taxa respiratória aumenta, ativando o processo de germinação, o que ocorre

paralelamente ao consumo das reservas. Tem início então a segunda etapa da germinação, denominada fase *Lag* (estacionária), que corresponde à fase de “montagem dos processos fisiológicos”. Em outras palavras, essa é a fase onde efetivamente as reservas são quebradas e a respiração, utilizando as reservas armazenadas no endosperma, é intensificada, permitindo o crescimento das estruturas do embrião. A conseqüência disso é a *ruptura da casca* e a *protusão da radícula* (última etapa do processo de germinação), processo considerado, sob o ponto de vista biológico, como uma evidência da germinação das sementes. Algumas espécies, todavia, ao invés de lançar a radícula como primeira estrutura durante a germinação, lançam, inicialmente, o *gancho plumular* (parte aérea) e somente depois a radícula.

As sementes podem ser classificadas em função de diferentes categorias. Uma delas é quanto à posição dos cotilédones, em relação ao solo, durante a germinação. As sementes são consideradas com germinação *epígea* quando os cotilédones são carregados para cima do solo pelo crescimento do hipocótilo, formando o gancho plumular. Como exemplos desse tipo de germinação podem ser incluídos o feijão, a soja, o algodão, a mamona etc., sendo a forma mais comum de germinação das eudicotiledôneas. Todavia, existem exceções, como as sementes de ervilha, que apresentam germinação hipógea. Nesse caso, o hipocótilo não alonga e sim o epicótilo. Na germinação *hipógea*, os cotilédones ficam embaixo da terra durante a germinação, sendo exemplos as sementes de milho, de trigo, de arroz, etc. Esse tipo de germinação é mais comum em monocotiledôneas, embora existam exemplos desse grupo, como a cebola, que apresenta germinação epígea.

Uma outra forma de classificação das sementes é quanto ao tipo de reserva armazenada no endosperma, estrutura responsável pelo armazenamento de amido, nas sementes de *endosperma amiláceo* (principalmente nos cereais), dos óleos, nas *oleaginosas*, e das *proteínas*. O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas. Entretanto, algumas espécies, como a soja, por exemplo, acumulam grandes

quantidades de proteínas em seu endosperma, sendo utilizadas como uma alternativa de fonte de proteínas para nutrição em animais. Isso não quer dizer, todavia, que as sementes da soja, como as sementes de todas as demais espécies vegetais, não apresentam as outras moléculas de reserva (amido e óleos), sendo a classificação das sementes, de cada espécie, dependente da proporção de cada um dos substratos de reservas armazenadas nos seus endospermas.

Quebra das Reservas do Endosperma/Cotilédones:

Após a embebição, as sementes que não se encontram em dormência têm o mecanismo germinativo ativado, entrando na *fase estacionária (Lag)*, etapa correspondente à montagem dos processos fisiológicos da germinação. Nessa etapa, as reservas de amido, lipídios e proteínas são quebradas pela ação de uma série de enzimas que atuam de forma conjunta, aumentando a transformação dessas substâncias em carboidratos solúveis (açúcares), substratos imediatos do processo respiratório.

Quebra do Amido:

O amido é formado por diversas unidades de glicose que se encontram ligadas através de dois tipos de ligações químicas. Nas *regiões lineares* do amido a ligação das moléculas de glicose é do *tipo α -1,4* (ligação abaixo do plano e entre os carbonos 1 e 4). Nos pontos de ramificação, as ligações são do *tipo α -1,6* (ligação abaixo do plano e entre os carbonos 1 e 6). Essas características das ligações nas moléculas são importantes para entendermos o processo de quebra do amido bem como para a caracterização das moléculas que compõem a sua estrutura, a *amilose* (linear) e a *amilopectina* (ramificada). Quanto maior a quantidade de amilose nas moléculas de amido mais fácil é a sua digestão para os animais (ex. amilo-milho). A quebra do amido pode se dar através da participação de *enzimas hidrolíticas* e/ou de *enzimas fosforolíticas*.

No primeiro caso, as enzimas hidrolíticas quebram as moléculas de amido utilizando água como componente no processo. Essa é a principal forma de quebra do amido nos cereais. Em trigo, o quebra do amido é bem conhecida e envolve a participação de enzimas hidrolíticas. O processo de germinação

nessa espécie tem início com a *embebição*. Durante a embebição há um aumento na *respiração* do embrião e a ativação da produção de *giberelinas* (GA_1 , principalmente) tanto nos tecidos do *embrião* quanto nos do *escutelo*. Nesses tecidos, as giberelinas ativam a síntese *de novo* de enzimas hidrolíticas, utilizando como substratos os aminoácidos componentes das proteínas armazenadas na camada de aleurona das sementes. Quatro enzimas são produzidas, *α -amilase*, *β -amilase*, *enzima desramificadora* (enzima D) e *α -glicosidase* (maltase).

- **α -amilase:** A α -amilase, como ressaltamos acima, não se encontra presente em sementes “secas”, sendo sintetizada *de novo* após a embebição e o aumento na biossíntese das giberelinas. A α -amilase é considerada como a primeira enzima a atuar na quebra das moléculas de amido, uma vez que é a única que consegue quebrar moléculas de amido intactas. Ela é uma *endoamilase*, ou seja, atua no interior da molécula do amido (não atua nas extremidades), quebrando somente as *ligações do tipo α -1,4*. Ela *não atua* nos pontos de *ramificação* (ligações α -1-6). A sua ação isolada não consegue quebrar toda a molécula de amido, resultando na produção de moléculas de glicose, de maltose e de pequenas moléculas de açúcares ainda ramificadas (dextrinas).

- **β -amilase:** Essa enzima também não se encontra presente em sementes “secas”, sendo sintetizada *de novo*. Ao contrário da α -amilase, a β -amilase é uma *exoamilase*, ou seja, atua de fora para dentro da molécula do amido (a partir da penúltima ligação, não atuando na última ligação). A β -amilase também quebra somente as ligações do *tipo α -1,4*, não atuando nos pontos de ramificação. A sua ação conjunta com a α -amilase melhora a quebra da molécula de amido, mas também não consegue quebrar toda ela. Da ação de ambas temos como produtos moléculas de glicose, maltose e moléculas menores de dextrinas.

- **Enzima D:** A enzima D também não é encontrada em sementes “secas”, sendo sintetizada *de novo*. Ao contrário da α -amilase e da β -amilase, que somente atuam em ligações do tipo α -1,4, essa enzima *atua nos pontos de ramificação* (ligações α -1,6), tornando as moléculas de

amido lineares (não ramificadas). Da ação dessas três enzimas hidrolíticas, temos como produtos, moléculas de glicose e de maltose.

- *Maltase* (α -glicosidase): Essa enzima também não é encontrada em sementes “secas”, sendo sintetizada *de novo*. Ela atua especificamente sobre as ligações α -1,4 da maltose, produzindo duas moléculas de glicose.

Portanto, a ação conjunta dessas quatro enzimas hidrolíticas resulta na produção de moléculas de glicose a partir das moléculas de amido, sendo a glicose um importante substrato para a glicólise e, conseqüentemente, para toda a respiração aeróbia, o que permite ao embrião crescer, rompendo o tegumento e as camadas de solo, se desenvolvendo numa nova planta. Além dessas enzimas, a *fosforilase do amido* (enzima fosforolítica) complementa a quebra das moléculas de amido, tendo como produto da sua ação catalítica *glicose-6P*, principal substrato da Rota das Pentoses Fosfato (RPF). Essa enzima também não é pré-existente nas sementes “secas”.

Quebra dos Lipídios:

Nas sementes, os lipídios são armazenados principalmente na forma de óleos (triglicerídeos), formados por moléculas de *glicerol*, um álcool de três carbonos, esterificado a duas moléculas de *ácidos graxos*. Nas sementes esses óleos são armazenados em organelas denominadas *oleossomos* (esferossomos), localizados no endosperma ou nos cotilédones. Essas organelas apresentam uma única unidade de membrana, sendo estabilizadas por pequenas moléculas de proteínas denominadas *oleosinas*. Após a embebição, também com a participação de porções do escutelo e do embrião, ocorre a síntese de giberelinas que vão ativar a síntese *de novo* de *lipases*, enzimas que quebram a ligação éster, liberando o ácido graxo do glicerol. Os ácidos graxos liberados se *difundem* através da membrana dos oleossomos para o interior de uma organela encontrada apenas em vegetais, os *glioxissomos*. Essa organela apresenta uma unidade de membrana. Nos *glioxissomos*, acontecem dois importantes processos de quebra dos lipídios, a β -oxidação e o *ciclo do glioxilato*. Na β -oxidação, cada molécula de ácido graxo é quebrada em moléculas de *Acetil CoA*, produzindo um número de moléculas proporcional à

metade do seu número de carbonos (a oxidação do ácido esteárico-18:0, por exemplo, gera 9 moléculas de *Acetil CoA*). São produzidas também moléculas de água e de NADH. O *Acetil CoA* produzido na β -oxidação serve de substrato para o outro ciclo existente nos glioxissomos, o *ciclo do glioxilato*. Esse ciclo, que pode ser considerado um Ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico) em miniatura, apresenta seis reações, tendo como função, em essência, a transformação do *Acetil CoA* em *succinato*. O *succinato*, então, é movido para a mitocôndria, organela com duas unidades de membranas, onde é convertido em *malato*, no Ciclo de Krebs. O *malato* é transportado para o *citossol*, sendo convertido em *oxalacetato* e, posteriormente, em *fosfoenol-piruvato* (PEP), num processo que consome NAD⁺ (na primeira reação) e ATP (na segunda reação) e libera CO₂. A saída do malato permite a entrada de mais moléculas de *succinato* provenientes dos glioxissomos. A partir do PEP, a glicólise pode operar no sentido inverso, produzindo glicose, num processo denominado *gliconeogênese* (glicólise reversa). O produto final desse processo é a *sacarose* que é formada a partir da *glicose* produzida na gliconeogênese. A sacarose, então, é translocada para os cotilédones, possibilitando o crescimento dos tecidos da plântula. O processo descrito acima é bem compreendido para a germinação de sementes de mamona (*Ricinus comunis*), sendo provavelmente similar em outras sementes que armazenam lipídios. Contudo, nem todas as sementes transformam quantitativamente os óleos em carboidratos. Em mamona, o endosperma degenera após o consumo das reservas de lipídios e de proteínas ser totalmente utilizada. Em muitas oleaginosas, como em sementes de girassol (*Helianthus annuus*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e em abóboras (*Curcubita* sp.), os cotilédones diferenciam em órgãos fotossintetizantes após as reservas serem consumidas. Nesses tecidos, apenas uma parte dos lipídios é convertida em carboidratos exportáveis. A maior parte dos carbonos derivados dos lipídios permanece nos cotilédones, contribuindo para a síntese dos cloroplastos e de outras estruturas celulares durante o enverdecimento. Durante esse processo, ocorre a transição na composição de organelas

celulares com a redução na quantidade de *glioxissomos* e no aumento na quantidade de *peroxissomos*. Essa transição se observa como resultado da redução na necessidade de quebra de lipídios e no aumento da necessidade de metabolizar os produtos da *fotorrespiração*, especialmente, o H_2O_2 . Esse fato pode ser considerado um marco *cito-fisiológico* da passagem do estado *heterotrófico* para o *autotrófico* durante a germinação e estabelecimento da nova plântula.

Quebra das Proteínas:

Durante a fase *Lag* de germinação das sementes, as proteínas são quebradas em seus aminoácidos, podendo funcionar como substratos para outras proteínas e enzimas (como vimos, anteriormente, para as enzimas de degradação do amido) ou como substratos respiratórios, tanto como intermediários glicolíticos quanto do Ciclo de Krebs. As proteínas em sementes são armazenadas na forma de *globóide* (fitina) e de *crystalóide* (proteínas birrefringentes). Em cereais as proteínas são acumuladas na camada (ou grãos) de aleurona.

Classificação das Sementes quanto a Tolerância à Dessecação:

As sementes podem ser classificadas também quanto a sua tolerância à dessecação (desidratação). As sementes são produzidas nos frutos com percentuais de água bastante elevados (+90%). À medida que as sementes amadurecem, elas se desidratam, atingindo valores de umidade bem reduzidos em algumas espécies (entre 15 e 7%), embora elas sempre mantenham certa hidratação em seus tecidos, devido seu ao elevado potencial matricial, o que é resultante da presença de estruturas encontradas nas sementes, especialmente o amido (desidratação extrema somente é observada em sementes mantidas em desidratadores). Os embriões das sementes de algumas espécies toleram bem essa condição de “desidratação”, suportando condições de baixo potencial hídrico que as plantas, estabelecidas no ambiente após a germinação, não toleram. Todavia, as sementes de outras espécies morrem se sofrerem desidratação. As sementes das espécies que apresentam tolerância à dessecação são classificadas como *ortodoxas*. Essas sementes apresentam

atividade intensa de determinados genes (*LEA = Late embryogenesis abundant*), que conferem tolerância à dessecação durante o estágio de sementes. As proteínas codificadas por esses genes conferem proteção às organelas e às estruturas celulares, evitando os danos causados pelo estresse hídrico. Após a germinação, a atividade desses genes cai e a plântula pode perder a tolerância à seca, observada nas sementes. Outras substâncias, como os açúcares e alguns osmólitos protetores/compatíveis como, por exemplo, a prolina e a glicinabetaína, por exemplo, armazenados no endosperma, também contribuem para a manifestação da tolerância à seca. A maioria das espécies apresenta sementes *ortodoxas*, cuja capacidade germinativa é aumentada à medida que a umidade da semente é reduzida após a colheita. Nas sementes que não apresentam tolerância à dessecação, classificadas como *recalcitrantes*, a atividade desses genes não é observada. Além disso, o embrião parece ser mais sensível à ação de radicais livres, sofrendo danos peroxidativos que causam a sua morte. Como exemplos de espécies que apresentam essa característica podem ser incluídas diversas espécies tropicais como a seringueira, o arará e o cupuaçu, dentre outras.

Dormência:

As sementes quando recém-colhidas nem sempre germinam imediatamente. Algumas delas passam, logo após a dispersão, por um período de *dormência*. A *dormência* se caracteriza pela *incapacidade* de germinação das sementes mesmo que as *principais condições ambientais* ativadoras do processo estejam *disponíveis*. O conceito de dormência difere do termo *quiescência*, que se caracteriza pela *não germinação* da semente em decorrência da *falta de algum fator ambiental* necessário a sua ativação. Portanto, uma semente “seca” de feijão, por exemplo, mantida em uma placa de Petri sem água, encontra-se em quiescência e não em dormência, uma vez que se for fornecida a água ela germinará imediatamente. O contrário acontece com as sementes verdadeiramente

dormentes, cujo fornecimento de água e de outros fatores ambientais para as suas sementes não resulta em germinação imediata.

A ocorrência de dormência em sementes tem caráter adaptativo, uma vez que ela geralmente evita a germinação em condições adversas para a plântula. A *dormência* é comum em espécies não domesticadas, sendo, entretanto, inadequada às sementes de espécies comerciais (agrícolas), que são selecionadas para germinarem rapidamente quando expostas a condições ambientais favoráveis. A dormência em sementes pode ser classificada em dois tipos: primária e secundária.

Dormência Primária:

A *dormência primária* é *geneticamente* controlada, sendo decorrente de mecanismos de defesa que evitam a germinação em condições desfavoráveis ou que prolongam tempo necessário à germinação, aumentando a probabilidade de dispersão e, conseqüentemente, reduzindo a competição intra-específica. Os principais tipos de dormência primária são causados pela *casca*, associados ao *embrião* (dormência interna), ou por *ambos*.

- Dormência causada pela Casca:

A casca (tegumento) da semente pode ser o fator causador da dormência. As sementes podem apresentar *casca dura* ou *impermeável*, rica em escleréides, tricômas e/ou em ceras (materiais hidrofóbicos), que endurecem a estrutura e/ou impedem a embebição. A *escarificação* é o procedimento utilizado para eliminar esta causa de dormência, podendo ser realizada pelo tratamento das sementes com ácidos (química), com água quente (térmica), com impactos e com lixas (mecânica), etc., fazendo com que o material que compõe a estrutura do tegumento seja lixado, arranhado e/ou quebrado e enfraquecido, facilitando a embebição e a posterior protusão da radícula ou do gancho plumular. A passagem de sementes pelo trato intestinal de animais é uma forma de escarificação mecânico-químico-térmica natural. Como exemplos de espécies que apresentam dormência associada à casca podem ser incluídos o flamboyant (ceras), o pessegueiro (drupa), a manga, o estílo, dentre outros. Quando a casca é retirada e a semente germina, a causa da dormência

pode ser seguramente associada ao tegumento. Quando ela mesmo assim não germina, a dormência pode ter causa embrionária ou tegumentar/embrionária.

- Dormência embrionária (ou interna):

A classificação dos tipos de dormência é bastante complexa. Alguns autores separam a dormência embrionária em suas causas ligadas ao embrião e naquelas associadas ao restante das partes internas ao tegumento da semente, principalmente ao endosperma. Algumas espécies apresentam concentrações elevadas de *substâncias inibidoras*, como o HCN (Rosaceae), a presença de *substâncias fenólicas solúveis*, como os fenóis e as cumarinas (substâncias solúveis em água e “lavadas” pelas chuvas), a presença de *etileno* (espécies dos Cerrados) e, principalmente, a presença de *ácido abscísico* (principal inibidor da ativação das hidrolases, principalmente da α -amilase, enzima envolvida na quebra das reservas do endosperma e, conseqüentemente, na germinação). Outras espécies germinam somente depois de queimadas, o que às vezes está associado à eliminação da casca mas, em outros casos, aos efeitos do etileno. Em desertos, algumas espécies somente germinam após uma seqüência de chuvas, que “lavam” substâncias inibidoras, assegurando se tratar de uma estação chuvosa. O período de dormência também parece estar associado à necessidade de desidratação das sementes (ortodoxas), o que por um lado, evita a germinação das sementes ainda dentro dos frutos, como ocorre, por exemplo, com sementes de feijão, que podem germinar ainda no interior das vagens quando ocorrem chuvas intensas na época da colheita. Esse fato está associado, principalmente, aos baixos níveis de ácido abscísico nas sementes dessa planta.

Em outras espécies, é o *embrião* que efetivamente encontra-se em dormência, o que geralmente está associado ao seu *desenvolvimento incompleto* (embrião mal-formado), como é comum em espécies de clima temperado que apresentam crescimento rápido de frutos. Um exemplo da ocorrência desse problema é bastante observado com as sementes de pessegueiro, que não germinam logo após a dispersão. A germinação das

sementes do pessegueiro exige a aplicação da prática da *estratificação*, que consiste na manutenção das sementes (amêndoa) sob *refrigeração* (temperatura entre 7-10°C), até que o embrião complete o seu desenvolvimento (15-30 dias). Posteriormente, a semente deve ser colocada para germinar em temperatura acima de 20°C, indicando que as baixas temperaturas da estratificação diferem das ideais para a germinação. A dormência embrionária também evita germinação das sementes do pessegueiro e de outras espécies de clima temperado durante o inverno, o que certamente levaria à morte da plântula.

Uma semente, após a superação da dormência, encontra-se em quiescência, uma vez que essa superação pode ocorrer em uma época em que as condições ambientais necessárias à germinação não se encontram disponíveis. Assim que elas se tornam disponíveis, a semente germina.

Dormência Secundária:

A dormência primária é geneticamente controlada, sendo decorrente de mecanismos de defesa que evitam a germinação em condições desfavoráveis ou que prolongam o tempo necessário à germinação, aumentando a probabilidade de dispersão e, conseqüentemente, reduzindo a competição intra-específica. Todavia, as sementes também podem apresentar dormência *secundária*, processo geralmente associado a *condições inadequadas de armazenamento* das sementes em depósitos (ensacadas) ou mesmo no solo (no banco de sementes), podendo se manifestar mesmo em sementes que tipicamente não apresentam dormência. Em depósitos, a dormência secundária pode se manifestar em situações de grande variação na UR_{ar}, onde o tegumento da semente é submetido a um processo de “estica-encolhe” que pode causar endurecimento da casca, dificultando ou impedindo a germinação. Além disso, a atividade respiratória aumenta e diminui, reduzindo a quantidade de reservas para a germinação quando as sementes são efetivamente plantadas. Em condições naturais, a dormência secundária se manifesta em sementes soterradas em profundidades que impedem a germinação e, mesmo

embebidas, as sementes não germinam. Caso a semente seja trazida à superfície por uma aração do solo, por exemplo, ela germina imediatamente.

Vigor e Longevidade das Sementes:

A capacidade germinativa das sementes, imediatamente após a dispersão, bem como após a completa maturação varia de acordo com o seu *vigor*. O vigor de uma semente se constitui na *capacidade* e nos *atributos fisiológicos* da semente que *culminam* com a sua *germinação* em *percentuais próximos* aos encontrados logo após a sua *dispersão*. Essa capacidade reduz com o passar do tempo, sendo influenciada pelas condições de armazenamento. A *longevidade* das sementes está intimamente relacionada à manutenção do vigor. Existem relatos de sementes germinando após mais de 150 anos em plantas mantidas em herbários, bem como casos ainda mais espetaculares, associados à germinação de sementes encontradas em catacumbas de faraós e soterradas em regiões turfosas. Nesses diferentes ambientes, uma característica comum é a manutenção bem constante das condições de UR e de temperatura, o que reduz a atividade metabólica, evitando a germinação.

Fotoblastismo:

O termo *fotoblastismo* descreve o fenômeno de resposta à qualidade da luz no controle da germinação apresentado pelas sementes de algumas espécies. As sementes que germinam em presença de luz são denominadas *fotoblásticas positivas*, enquanto que, aquelas que germinam no escuro, são denominadas *fotoblásticas negativas*. Existem, ainda, as sementes *fotoblásticas neutras* ou *não-fotoblásticas*, que correspondem à maioria, e que germinam tanto na presença de luz quanto no escuro.

Esse fenômeno foi associado à participação de um pigmento encontrado em plantas, o *fitocromo*. Os avanços mais importantes na identificação do fitocromo foram realizados entre os anos de 1945 e 1960,

com a participação expressiva de pesquisadores do Departamento de Agricultura dos EUA. Os pesquisadores, liderados por Harry Borthwich e Sterling Hendricks obtiveram resultados espetaculares em trabalhos com sementes de alface do tipo *Grand Rapids* expostas a tratamentos alternados com as luzes vermelha e vermelho-longo. Aproximadamente 100% das sementes que recebiam luz vermelha germinavam ao final dos tratamentos. Contudo, as sementes que recebiam luz vermelho-longo apresentavam intensa redução na germinação. Quando as sementes eram expostas à luz vermelho-longo imediatamente após terem sido tratadas com luz vermelha, a germinação das sementes era inibida. O contrário ocorria quando um *flash* de luz vermelha era dado às sementes após o tratamento com luz vermelho-longo. Nessa condição, a germinação era aumentada. Através de tratamentos repetidos, alternando exposições rápidas com as luzes vermelha e vermelho-longo, eles estabeleceram que a qualidade da luz, ou seja, a faixa do espectro luminoso aplicada por último é que controlava a germinação ou não das sementes, sendo que a luz vermelha promovia a germinação enquanto a luz vermelho-longo inibia.

Moléculas de fitocromo são encontradas em todos os órgãos da planta, inclusive em sementes. O fitocromo é uma proteína solúvel com massa molecular de aproximadamente 250 kDa. Ele ocorre na forma de um dímero composto por duas subunidades equivalentes. Cada subunidade apresenta dois componentes: uma molécula absorvedora de luz, o *cromóforo*, e uma cadeia polipeptídica, denominada *apoproteína*. O cromóforo do fitocromo é formado por um *tetrapirrol de cadeia aberta*, denominado *fitocromobilina*. Esse, por sua vez, se liga à proteína através de uma ligação tioéter que é acoplada a um resíduo de cisteína (CYS₃₂₁). Em função do espectro de absorção do fitocromo ser bastante parecido com o da clorofila, bem como em função da concentração de clorofila ser bastante elevada (*pigmento de massa*), a extração do fitocromo (*pigmento informacional*) deve ser realizada em plantas estioladas (crescidas no escuro). Em plantas estioladas o fitocromo encontra-se presente na forma que absorve a luz vermelha, denominada Fv. Esta é a forma de fitocromo sintetizada nas plantas no escuro. A forma Fv, que é azul, é convertida pela luz vermelha

para a forma que absorve luz vermelho-longo, denominada Fve, que, por sua vez, é azul-esverdeada. A forma Fve, pode ser convertida de volta para a forma Fv pela ação da luz vermelho-longo. Esta fotorreversibilidade é a propriedade mais distinta do fitocromo. Embora as duas formas de fitocromo sejam referidas pelos seus picos máximos de absorção no vermelho (V) ou no vermelho-longo (VL), o espectro de absorção das formas Fv e Fve se sobrepõem significativamente na região do vermelho, sendo que a forma Fv também absorve uma pequena quantidade de luz na região do VL. Como consequência, há um equilíbrio dinâmico entre as duas formas de fitocromo. Quando moléculas do Fv são expostas à luz vermelha, a maior parte absorve esta faixa do espectro e é rapidamente convertida para a forma Fve. Entretanto, algumas moléculas do Fve formado também absorvem a luz V e são, em contrapartida, convertidas de volta para a forma Fv, uma vez que tanto o Fv quanto o Fve absorvem luz vermelha. Desse modo, a proporção de fitocromo na forma Fve, após a saturação da irradiação com luz V, é de apenas 85% e não de 100% como seria esperado caso os espectros não sofressem sobreposições. De modo similar, uma pequena quantidade da luz VL absorvida pela forma Fv torna impossível a conversão de todo o Fve para a forma Fv em resposta à aplicação de um espectro amplo de luz VL. Ao invés disso, um equilíbrio de 97% de Fv e de 3% de Fve é obtido. Este equilíbrio é denominado estado fotoestacionário. A fotoconversão do Fv para Fve e do Fve para o Fv não é um fenômeno que se processa em uma única etapa. Várias formas espectrais de vida curta são produzidas em seqüência antes que uma das formas, Fv ou Fve, seja gerada. Sob condições de luz branca, tanto o Fv quanto o Fve tornam-se excitados e, portanto, formas intermediárias são produzidas, correspondendo a uma fração considerável do conteúdo total do fitocromo. Tais intermediários podem ser importantes no início ou na ampliação das respostas relacionadas ao fitocromo, sob condições de iluminação natural. Em sementes desidratadas, o último passo da conversão do Fv para Fve é impedido, sendo que, após a re-hidratação, ocorre a restauração completa da molécula. Em adição à absorção na

região do vermelho, ambas as formas do fitocromo também absorvem na região do espectro correspondente ao azul. Portanto, os efeitos do fitocromo também podem ser ativados pela luz azul, que pode converter o Fv em Fve.

Algumas espécies domesticadas e um grande número de espécies não domesticadas apresentam o fenômeno de fotoblastismo, o que para algumas espécies está relacionado a proteção contra a germinação em ambientes com falta de luz, fator que limita a fotossíntese. A ação do fitocromo é fundamental, uma vez que ele consegue “medir” não apenas a presença de radiação (intensidade), mas, principalmente, a qualidade da luz que está chegando à superfície onde se encontra as sementes. Tal fato explica, por exemplo, o aparecimento de algumas espécies de plantas, não observadas previamente em determinada área, após a realização de aragem do solo e de desmatamentos, que, respectivamente, expõe sementes soterradas e altera a qualidade

LOGIA

VEGETAL

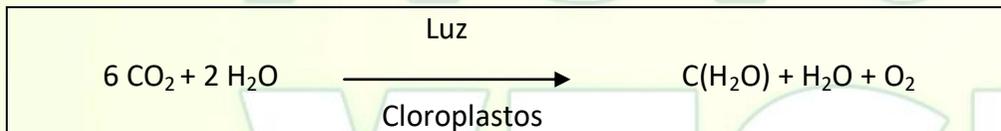
UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



3. FOTOSSÍNTESE:

A fotossíntese é um processo fisiológico ativado após a germinação e que ocorre exclusivamente em presença de luz. A principal função da fotossíntese é a produção de carboidratos (açúcares solúveis) que são os “combustíveis” utilizados no processo respiratório. A fotossíntese ocorre não apenas nas fanerógamas, mas, também em criptógamas, em algas e em bactérias.

A fotossíntese pode ser definida como um processo que envolve “síntese em presença de luz”. Todavia, essa definição é uma simplificação do intrincado sistema de vias metabólicas, pigmentos, enzimas, gases e estruturas morfológicas envolvidas na sua realização, conforme veremos ao longo desse capítulo. A equação a seguir resume o processo fisiológico da fotossíntese:



A fotossíntese compõe-se de três processos parciais:

- O *processo fotoquímico*, que resulta na conversão da energia luminosa em energia química, com a formação de ATP e de NADPH, envolvendo a participação dos pigmentos, na absorção da energia radiante, e das coenzimas (transportadoras de elétrons);

- O *processo físico de transporte dos gases*, especialmente do CO₂ e do O₂, que por difusão, são transportados do meio externo até o estroma, onde ocorrem as reações bioquímicas da fotossíntese e;

- O *processo bioquímico*, relacionado à redução do CO₂ a açúcares, envolvendo várias reações químicas e enzimas.

Processo ou Fase Fotoquímica:

A compreensão de algumas características da radiação luminosa é o primeiro passo necessário ao entendimento da fotossíntese. O físico inglês Isaac Newton, em 1672, propôs a teoria de que a luz seria formada por um *feixe de*

partículas que emitidas por uma fonte de radiação (componente corpuscular). Foi Albert Einstein, usando as idéias de Max Planck, que conseguiu demonstrar que os *feixes de luz* são pequenos *pacotes de energia* e estes são os *fótons*, explicando, assim, o fenômeno da *emissão fotoelétrica*. James Clerk Maxwell, ainda no século XIX, provou que a velocidade de propagação de uma onda eletromagnética no espaço equivalia à velocidade de propagação da luz (aproximadamente 300.000 km/s). Foi de Maxwell a afirmação de que a *luz* é uma “*modalidade de energia radiante*” que se “*propaga*” através de *ondas eletromagnéticas*. Essas considerações levaram à definição final da “*Teoria da dualidade onda-partícula*”, pela qual a *luz* apresenta características tanto *corpusculares* quanto *ondulatórias*. A luz corresponde a uma pequena fração da *radiação eletromagnética, perceptível ao olho humano, sendo formada por movimentos ondulatórios emitidos na forma de pacotes de energia (fótons)*. Num sentido mais geral, a *luz visível* pode ser definida como qualquer *radiação eletromagnética* que se situa *entre* as gamas do *ultravioleta* e do *infravermelho*.

Dentre diversas características, a luz apresenta duas muito importantes: o *brilho* (intensidade) e a *cor* (frequência). A medição da luz pode ser realizada por diferentes equipamentos, quantidades e unidades: brilho (watts/cm²); iluminância ou iluminação (lux); fluxo luminoso (lumen); intensidade luminosa (candela). Todavia, para as plantas, atualmente, a radiação luminosa é medida em termos da densidade de fluxo de fótons de radiação fotossinteticamente ativa (RFA), cuja unidade é *μmoles de fluxo de fótons m⁻² s⁻¹*.

Para se ter uma idéia, em termos de brilho, a intensidade de radiação solar na superfície externa da terra (denominada insolação ou brilho) é de 1.360 watts m⁻². Comparativamente, a intensidade de radiação de uma lâmpada de 100 watts, a 3 metros de distância, é de 0,88 watts/m². Em termos de densidade de fluxo de fótons, o valor correspondente ao brilho de 1.360 watts/m² da radiação solar seria superior a 27.000 μmoles de fluxo de fótons m⁻² s⁻¹, o que é muito maior

que aos 1800 μmoles de fluxo de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (corresponde a 400 watts m^{-2}) de radiação global que efetivamente chegam ao nível do mar. Este valor varia com a latitude e com as condições climáticas. Isso mostra que a maior parte da radiação proveniente do sol é filtrada pelas camadas superiores da atmosfera, atenuando a energia que chega até a superfície do solo, onde as plantas são cultivadas. A radiação UV emitida pelo sol é filtrada pela camada de ozônio e pelo oxigênio, enquanto que a radiação infravermelha (calórica) é filtrada pelo vapor de água e pelo CO_2 . De toda a radiação solar que efetivamente entra na terra, apenas 45% cai na faixa espectral correspondente a 380-710 nm, que corresponde à radiação fotossinteticamente ativa (efetivamente considerada entre 400 e 700 nm).

A energia emitida por diferentes fontes de radiação eletromagnética pode ser medida pelo que preconiza a Lei de Planck, que explica como as diferentes faixas de cor do espectro de radiação correspondem a diferentes intensidades de energia (frequência). Conforme a definição atualmente aceita, a luz apresenta características tanto corpusculares quanto ondulatórias. Segundo Planck, a energia (E) de um fóton pode ser medida pela frequência (ν) de emissão de radiação desse fóton. Como a frequência é definida pela relação entre a velocidade da luz (c) e o comprimento de onda (λ), a energia de um fóton é representada pela relação:

$$E = h \nu, \text{ onde:}$$

$$\Rightarrow \nu = c/\lambda$$

$\Rightarrow h$ = constante de Planck; constante física usada para descrever o tamanho dos quanta (= fótons), tendo papel fundamental na Teoria de Mecânica quântica (denominação homenageia a Max Planck, um dos fundadores da Teoria Quântica). Seu valor é de aproximadamente de $h = 6,6 \times 10^{-27} \text{ erg s}$. Logo, a energia de um fóton (denominada *quantum*) pode ser determinada pela equação:

$$E = h \cdot c/\lambda$$

Portanto, pela equação que descreve a Lei de Planck, é possível concluir que a energia de um fóton (E) é *inversamente proporcional* ao seu comprimento

de onda (λ). Com isso, quanto mais curto o comprimento de onda, maior será a energia do fóton e, quanto mais longo, menor será a sua energia.

O espectro de radiação pode ser obtido com a utilização de *espectroradiógrafos*, que delimitam as faixas de radiação correspondentes à energia emitida pela fonte de radiação utilizada. Um resumo do espectro de radiação emitido pelo sol, é apresentado abaixo:

Para que a energia luminosa seja utilizada pelos sistemas vivos, é necessário que ela seja absorvida. Nas plantas a absorção dessa energia é realizada pelos pigmentos fotossintetizantes. O padrão de absorção da luz por parte dos pigmentos é denominado espectro de absorção, sendo obtido com a utilização de *espectrofotômetros*. Segundo a *Lei da Equivalência Fotoquímica*, cada pigmento pode absorver apenas um fóton, sendo que este *fóton estimula apenas um elétron de cada vez*. Normalmente, os pigmentos apresentam picos de absorção nas regiões correspondentes às suas cores complementares, conforme o esquema abaixo:



-----Faixa visível-----										
	UV	UV próximo	Violeta	Azul	Verde	Amarelo	Laranja	Vermelho	Vermelho longo	Infravermelho
λ	10	380	455	500	580	589	620	700	775	>1000
+ energia	-----									
- energia	-----									
* λ (nm)										

A ativação da fotossíntese, após a germinação, ocorre somente se a plântula formada estiver exposta à luz. As sementes germinadas no escuro ou em intensidade luminosa reduzida originam plântulas que apresentam aparência pálida e translúcida, quase etérea. Essa forma "*estiolada*" difere

bastante daquela observada em plântulas crescidas na presença da luz, as quais possuem crescimento reduzido, folhas bem desenvolvidas e coloração verde. O estiolamento, do francês *étiole*, que significa *alvejar*, é uma condição que envolve o aumento do alongamento caulinar, o desenvolvimento foliar reduzido e a ausência de clorofila. Esse programa de desenvolvimento, ativado sob condições de escuridão ou sob intensidade luminosa reduzida, denomina-se *escotomorfogênese*, derivada de *skotos*, palavra de origem grega, que significa *escuridão*. A princípio, essa resposta diferenciada foi atribuída e associada à fotossíntese. Entretanto, posteriormente, constatou-se que a transformação de uma plântula estiolada em uma planta verde (enverdecimento), ao contrário dos processos relacionados à fotossíntese, ocorre mesmo sob condições de baixa intensidade de fluxo de fótons e em tempo reduzido de exposição à luz. Algumas horas após a aplicação de um único *flash* (exposição rápida) de intensidade luminosa reduzida, plântulas crescidas no escuro apresentam reduções na taxa de extensão do caule e no início da abertura do gancho apical e a ativação da biossíntese de pigmentos cloroplastídicos. A luz atua, portanto, como um sinal, induzindo mudanças na forma da plântula que cresce embaixo do solo, promovendo um crescimento adaptativo sob condições de luz plena. A fotossíntese não pode dirigir tal processo, uma vez que a *clorofila* ainda não está presente durante essa fase do desenvolvimento.

Aparentemente, a estiolação, que se manifesta pelo crescimento longitudinal rápido e intenso observado em plântulas mantidas no escuro, é um mecanismo utilizado no sentido de possibilitar, o mais rápido possível, que seu ápice seja exposto à luz, desencadeando o processo fotossintético antes que o suprimento de reservas armazenadas no endosperma seja exaurido, caracterizando uma importante estratégia de sobrevivência. Em contraste à estratégia de afluência, a *fotomorfogênese*, observada na presença de luz, é usada quando a planta utiliza suas reservas o mais rápido possível, visando à formação de estruturas que são requeridas para a fotossíntese e para o transporte de água e de assimilados. Muito provavelmente, as bases genéticas da escotomorfogênese foram desenvolvidas desde o advento das plantas com

sementes, objetivando a otimização da informação gênica para o desenvolvimento pós-embriônico do esporófito.

Estudos genéticos realizados com plantas mutantes de *Arabidopsis* resultaram na identificação dos genes *De-Etiolated* (*DET1*) e *Constitutive Photomorfogênic* (*COP*). Esses estudos, conduzidos em escuridão completa, resultaram na obtenção de indivíduos com fenótipos similares aos observados em plântulas crescidas na presença de luz. A natureza recessiva das mutações em *cop/det/fus*, juntamente com seu fenótipo, indicam que *COP/DET/FUS* atuam como repressores da fotomorfogênese. Os genes *COP/DET/FUS* são inativados por sinais luminosos percebidos pelos fotorreceptores (fitocromo e criptocromo). Esses mutantes, aparentemente, controlam um subconjunto de processos associados à resposta fotomorfogênica e podem atuar em pontos das vias de desenvolvimento localizados posteriormente à definição primária entre a escoto- e a fotomorfogênese. Além disso, a natureza recessiva desses genes indica que os seus produtos funcionam na repressão da fotomorfogênese no escuro, enquanto que a presença da luz, percebida por fotorreceptores múltiplos, resulta em inativação das suas funções repressivas. Todos os genes *COP/DET/FUS* identificados operam através da repressão direta ou indireta da transcrição dos genes induzidos pela luz e, dessa forma, reprimem a via normal da fotomorfogênese no escuro.

Após o recebimento da luz, a plântula que está se formando reduz o seu crescimento (estiolamento) e fica verde. Essa transformação envolve a produção de dois tipos básicos de pigmentos, as *clorofilas* e os *carotenóides*. Todavia, antes mesmo que esses pigmentos sejam formados, diversas transformações ocorrem na estrutura de organelas presentes nos tecidos da plântula. A presença de um tipo específico de plastídio, denominado *pró-plastideo*, é observada no embrião das sementes (antes da germinação), nas folhas jovens e nos meristemas. Esse tipo de plastídio apresenta dupla-membrana, DNA próprio (são organelas semi-autônomas), ribossomos (70S) e um corpo pró-lamelar (emaranhado de membranas que originam os tilacóides ou lamelas). Da mesma forma que

consideramos para as mitocôndrias, a presença dos cloroplastos 70S e a existência de dupla-membrana são características que direcionam para a teoria da *endossimbiose* como explicação provável para a origem dos pró-plastídios. Os pró-plastídios são os precursores de todos os plastídios encontrados em plantas. Durante o desenvolvimento das plantas eles podem seguir duas vias, o que depende diretamente, se a germinação ocorre em presença de luz ou no escuro. Quando a germinação ocorre no escuro, os pró-plastídios originam os *etioplastos* (característicos das plantas estioladas). Quando a germinação ocorre em presença de luz, eles originam os *cloroplastos* (acumulam clorofila e carotenóides). Os pró-plastídios também podem dar origem aos *cromoplastos* (plastídios coloridos que acumulam carotenóides, como o licopeno, da casca do tomate, e o β -caroteno, da cenoura) e aos *leucoplastos* (plastídios incolores, como os amiloplastos). Uma característica marcante dos plastídios é a sua capacidade de interconversão. Assim, os cloroplastos podem originar etioplastos, quando a planta é trazida da luz para o escuro. O inverso acontece, por exemplo, com a batata-inglesa, que apresenta leucoplastos. Seus tubérculos podem ficar com a casca verde (transformação de amiloplastos em cloroplastos) quando senescentes ou mantidos próximos às fontes de luz. Os cromoplastos, ao contrário, são considerados plastídios senescentes, normalmente não originando outros tipos de plastídios, embora existam algumas exceções, como na laranja pêra-rio, por exemplo, que fica com sua casca verde em pós-colheita (quando colhida madura a sua casca é amarela).

Os *cloroplastos* são organelas que apresentam *dupla-membrana* (*envelope do cloroplasto*), o *estroma* (uma matriz fluida e rica em água) e um conjunto de membranas internas (*tilacóides*) que ficam imersas no estroma. Os tilacóides apresentam composição lipídica rica em *ácidos graxos polinsaturados*, que conferem extrema fluidez, embora tornem os tilacóides muito sensíveis à ação peroxidativa causada por radicais livres. As porções não-empilhadas das membranas dos tilacóides, que ficam em contato direto com o estroma, são denominadas *tilacóides do estroma*. As porções prensadas ou empilhadas são denominadas *tilacóides do grana*. Os tilacóides, ao contrário do que alguns livros sugerem, não se tratam de moedas empilhadas. Eles são, na verdade,

formados por inúmeras dobras das membranas, que permitem a criação de um ambiente, no interior dessas dobras, denominado *lúmen do tilacóide*. Entre o *lúmen* e o *estroma* é que se forma o *gradiente de potencial eletroquímico na fotossíntese*, utilizado, como vimos na respiração, para a produção de ATP, que é essencial à transformação do CO_2 atmosférico em açúcares. Os pigmentos envolvidos na fotossíntese se ligam às membranas dos tilacóides, localizando-se, mais especificamente, nos fotossistemas (serão tratados mais a frente), não sendo encontrados no estroma ou mesmo nas duas membranas (envelope) dos cloroplastos. Isso acontece em função da natureza *hidrofóbica* (apolar) dos pigmentos, que se “preendem” (clorofilas) às membranas ou são efetivamente solúveis (carotenóides) nas porções hidrofóbicas das membranas. O processo fotoquímico da fotossíntese acontece nas membranas dos tilacóides (nos fotossistemas), enquanto o processo bioquímico acontece no estroma.

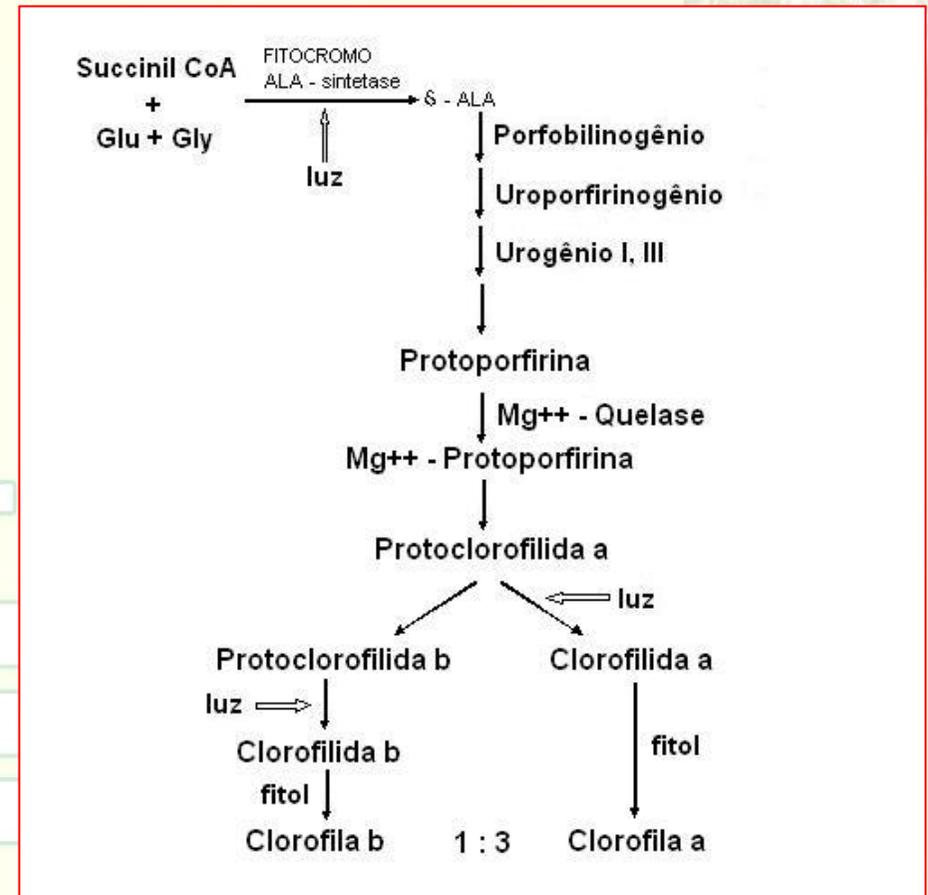
Os principais pigmentos fotossintetizantes são as *clorofilas*, os *carotenóides* e as *ficobilinas*. Os dois primeiros são lipossolúveis e característicos das angiospermas. As ficobilinas são hidrossolúveis, sendo encontradas em bactérias e em algas. A *clorofila* é o pigmento responsável pela coloração verde das folhas das plantas. Esse pigmento *absorve luz* nos comprimentos de onda correspondentes ao *azul-violeta* e, principalmente, no *vermelho-vermelho-longo*. Os *carotenóides* são pigmentos solúveis em lipídios, apresentando coloração *vermelha, laranja* ou *amarela*, sendo encontrados em todos os cloroplastos e em cianobactérias. Em tecidos verdes, a coloração dos carotenóides é mascarada pela coloração das clorofilas. A terceira classe de pigmentos é constituída pelas ficobilinas, encontradas nas cianobactérias e em cloroplastos de algas vermelhas, que, diferentemente dos carotenóides, são solúveis em água.

Biossíntese dos Pigmentos Fotossintéticos:

Biossíntese das clorofilas:

A biossíntese das clorofilas tem como *precursores* o *succinil-CoA*, o *ácido glutâmico* e a *glicina*, substâncias oriundas do metabolismo primário.

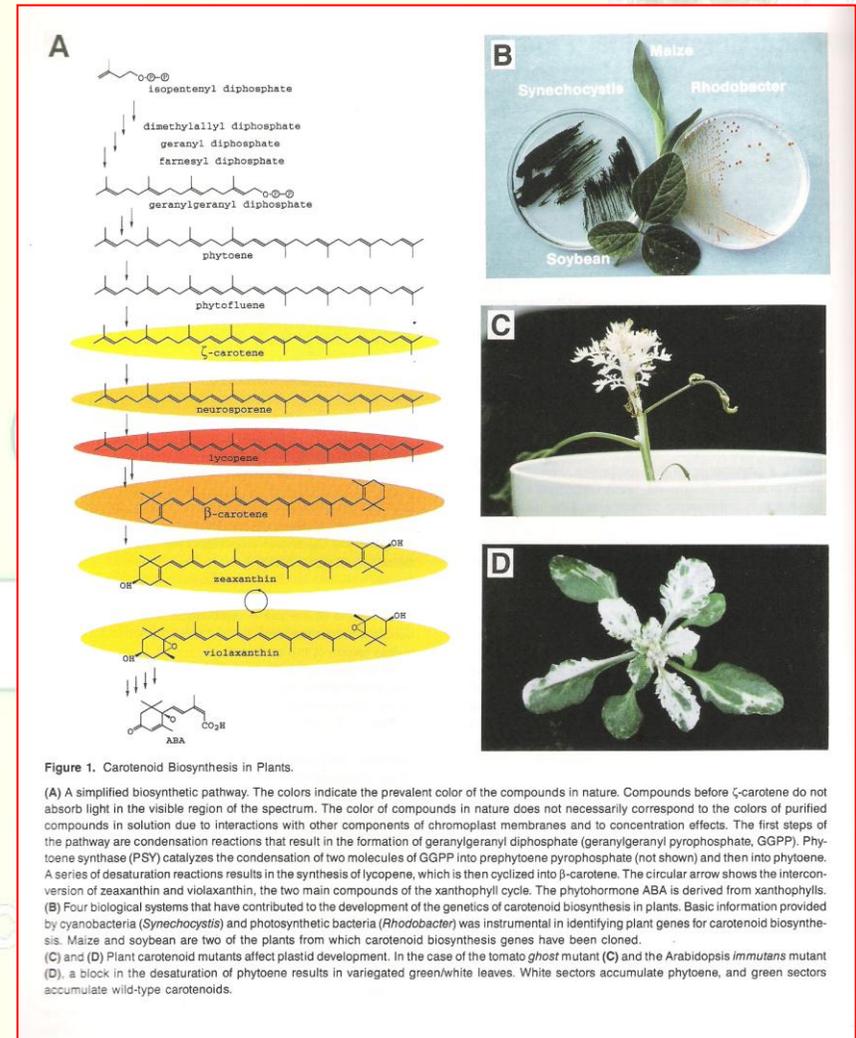
O início da síntese é ativado pela luz, que é percebida pelo *fitocromo* (encontrado nas sementes), que ativa a enzima *ALA-sintetase*, produtora do ácido δ -amino-levulínico (δ -ALA). As moléculas das clorofilas *a* e *b* são formadas por duas porções específicas: a *cromofórica*, responsável pela captação da luz, sendo constituída por um *tetrapirrol de cadeia fechada*, cujo interior apresenta um átomo de Mg^{2+} (quelato). A presença desse átomo é fundamental para a manutenção da coloração verde das moléculas das clorofilas. Quando as clorofilas perdem esse átomo (naturalmente) ou por oxidação, o seu espaço é preenchido por dois átomos de H^+ , sendo as moléculas formadas denominadas *feofitina*. A existência de ligações conjugadas (simples e duplas-ligações alternadas) permite a interferência e a captura da energia radiante por parte da estrutura do cromóforo. As clorofilas *a* e *b* são derivadas de um intermediário comum na rota de biossíntese, a *protoclorofilida a*, molécula que já apresenta coloração ligeiramente esverdeada. Após a formação da protoclorofilida *a* e antes da formação das *clorofilidas a* e *b*, há, novamente, a necessidade de luz para a complementação da biossíntese. Na última etapa do processo de biossíntese uma “cauda” denominada *fitol* é esterificada ao tetrapirrol, originando as estruturas das clorofilas *a* e *b*, cuja proporção característica em plantas *heliófilas* é de 3:1, o que é alterado (aumenta a clorofila *b* e diminui a clorofila *a*) em plantas *umbrófilas*. O fitol é um álcool bastante apolar (hidrofóbico). Essa estrutura possibilita que as moléculas de clorofila se “premam” às membranas dos tilacóides, uma vez que o tetrapirrol, por si, apresenta natureza hidrofílica. A elevada apolaridade da cauda fitol torna as moléculas das clorofilas *a* e *b* predominantemente apolares, embora sejam menos apolares que as moléculas dos carotenóides. A única diferença entre as moléculas das clorofilas *a* e *b* encontra-se no *anel pirrólico de número dois*. Na clorofila *a* um *grupo metil* (CH_3) se liga ao anel, enquanto na clorofila *b* a ligação se dá a um *grupo carbonila/aldeído* (CHO). As clorofilas bacterianas também diferem das clorofilas dos vegetais apenas nesse anel. A biossíntese das clorofilas pode ser resumida no esquema a seguir:



Biossíntese dos Carotenóides:

Os carotenóides são pigmentos solúveis em lipídios (e em solventes orgânicos), de coloração amarela, laranja ou vermelha, sendo encontrados em plantas e em cianobactérias. A biossíntese dos carotenóides ocorre inicialmente utilizando os mesmos substratos e intermediários da biossíntese de lipídios e das giberelinas. O *isopentenil difosfato* é considerado o precursor da sua rota biossintética. A primeira etapa da biossíntese envolve a transformação do *geranyl difosfato* em *fitoene*. Uma série de *reações de desaturação* resulta na síntese do *licopeno* (cor vermelha da casaca do tomate) que então sofre uma *ciclização* formando o β -*caroteno* (coloração alaranjada da cenoura; principal fonte de vitamina A (retinol) para os animais). O composto ζ -*caroteno* (ζ = zeta) não absorve luz na região do visível. As cores desses compostos na natureza não necessariamente correspondem às cores dos compostos em solução, o que ocorre devido às interações com outros componentes das membranas dos cromoplastos e pelo efeito de concentração.

Os carotenóides contribuem para a absorção da energia radiante, transferindo a energia de excitação às clorofilas *b* e *a*, aumentando a eficiência do processo de captura da energia radiante. Todavia, além dessa função, os carotenóides contribuem de modo fundamental para a proteção do aparelho fotossintético, evitando a fotoxidação das clorofilas, através da extinção rápida do estado excitado das suas moléculas. Essa atuação depende diretamente do *ciclo das xantofilas*, onde as *interconversões* observadas entre as moléculas de zeaxantina e de violaxantina dissipam o estado de excitação das clorofilas, contribuindo como antioxidantes desses pigmentos, evitando a formação de radicais livres, decorrentes da transferência de elétrons das clorofilas para o oxigênio. Sem a contribuição dos carotenóides não seria possível a ocorrência da fotossíntese em presença de oxigênio e de luz. A violaxantina é também precursora da biossíntese do ácido abscísico (ABA). Em folhas verdes, a cor dos carotenóides frequentemente é mascarada pela abundante presença das clorofilas, mas em regiões temperadas e durante a senescência foliar, os carotenóides tornam-se visíveis quando as clorofilas são destruídas no outono ou com o envelhecimento natural das folhas.



Nem todos os pigmentos encontrados nas plantas participam do processo fotossintético. As antocianinas, não contribuem em nada para o processo de transferência de energia durante a fotossíntese. Ao contrário dos pigmentos que participam da fotossíntese, que são lipossolúveis, as

antocianinas são hidrossolúveis, sendo armazenadas nos vacúolos. Todavia, as antocianinas, em função de sua localização e em decorrência do tamanho dos vacúolos que ocupam grande parte da célula, podem atuar na proteção do aparelho fotossintético como filtros da radiação UV, que pode destruir os pigmentos. Ao contrário das clorofilas e dos carotenóides, as antocianinas têm a sua coloração dependente do pH, variando do azul ao vermelho, embora algumas sejam incolores. A presença das antocianinas em algumas folhas pode mascarar completamente as clorofilas (que por sua vez mascaram os carotenóides), condicionando colorações diferentes do verde nesses e em outros órgãos. O acúmulo de antocianina é estimulado por níveis elevados de luz, por deficiência de certos nutrientes (principalmente, N, P e S) e por temperaturas baixas.

Cada pigmento que participa da fotossíntese apresenta uma coloração que está diretamente relacionada às suas estruturas químicas. Como ressaltamos anteriormente, cada pigmento apresenta regiões de absorção específicas no espectro de radiação que, geralmente, correspondem às suas cores complementares. Os pigmentos carotenóides apresentam comportamento característico, apresentando pico de absorção da radiação nas faixas correspondentes às suas cores complementares (azul-violeta), absorvendo bem radiação com maior energia. Todavia, as clorofilas, além de absorverem nas faixas correspondentes a sua cor complementar (vermelho e vermelho-longo), também absorvem na região do azul-violeta, embora os picos máximos de absorção encontrem-se nas faixas de menor quantidade de energia do espectro (vermelho e vermelho-longo). A determinação das faixas de absorção características de cada pigmento pode ser obtida com a utilização de espectrofotômetros, equipamentos que utilizam o princípio da decomposição das radiações componentes da luz branca pela sua passagem através de um prisma. Cada faixa de radiação (monocromática) é obtida pela sua seleção (comprimento de onda) por um filtro (monocromador). Esses equipamentos permitem determinar o espectro de absorção de cada pigmento, o que consiste na determinação da absorção relativa (absorvância) do pigmento em cada comprimento de onda (λ). Quando se estuda os efeitos da luz de diferentes

comprimentos de onda, usando quantidades não saturantes, num processo fisiológico, como a fotossíntese, obtém-se um “espectro de ação”. O *espectro de ação*, comparado com o *espectro de absorção* do pigmento, ajuda a elucidar a possível participação de um pigmento no processo.

O funcionamento dos espectrofotômetros pode ser explicado pela Lei de Lambert-Beer, que permite determinar, de um modo quantitativo, a concentração de substâncias que absorvem radiação em solução. A Lei de Lambert-Beer é uma relação matemática que forma a base da análise espectrofotométrica e mostra que a absorvância de uma solução é diretamente proporcional à concentração somente até um certo limite, apresentando ajustamento logarítmico. Portanto, dentro da faixa de proporcionalidade direta, o valor da absorvância é diretamente proporcional à concentração da solução. A equação abaixo é a representação matemática da Lei de Lambert-Beer

$$A = - \log (I/I_0) \Rightarrow A = a b c, \text{ onde:}$$

A = absorvância medida no espectrofotômetro, **I₀** = intensidade da luz incidente em determinado comprimento de onda, **I** = intensidade transmitida pela amostra, **b** = caminho óptico pela amostra (distância que a luz percorreu por ela, geralmente, 1 cm), **a** = constante conhecida como absorvidade molar (a qual varia de substância para substância e com o solvente), e **c** = concentração da substância.

Processo Fotoquímico da Fotossíntese:

Para os leigos que observam uma planta, principalmente as suas folhas, é possível que se conclua que as folhas são completamente verdes. Todavia, quando estudamos anatomicamente caules e folhas, nós verificamos que a presença de pigmentos verdes se restringe a algumas células (principalmente nos parênquimas clorofilianos), sendo a ocorrência desses pigmentos restrita aos cloroplastos. Essa organela, a “olho nu”

também parece totalmente clorofilada. Todavia, quando essa organela é estudada em microscopia eletrônica, é possível verificar que os pigmentos se restringem às membranas dos tilacóides. Da mesma forma, nem toda a membrana de cada um dos tilacóides apresenta pigmentos verdes, sendo esses restritos ao que denominamos *fotosistemas*, definidos como *complexos protéicos pigmentados*.

Três experimentos interessantes são considerados bases para a identificação dos fotosistemas. No final da década de 50 e início da década de 60, vários experimentos relacionados à fotossíntese foram conduzidos. Num desses experimentos foi medida a produção quântica (recíproca do número de fótons necessários para a redução de uma molécula de CO₂ em açúcar) em resposta à variação no comprimento de onda. Os resultados mostraram uma queda drástica na produção quântica quando o material foi iluminado com radiação na faixa do vermelho-longo (acima de 680 nm). Tal fato ficou conhecido na literatura como *red drop* (queda no vermelho). Posteriormente, um outro experimento conduzido por *Emerson e colaboradores* encontrou um resultado muito interessante. Eles verificaram que quando plantas eram iluminadas com lâmpadas vermelhas (isoladamente) ou com lâmpadas vermelho-longo (isoladamente), a taxa de fotossíntese relativa era menor do que quando elas eram iluminadas com as duas lâmpadas ao mesmo tempo, sendo, ainda, o valor encontrado superior ao somatório da produção quântica de cada uma das lâmpadas. Tal fato ficou conhecido na literatura como "*efeito intensificador de Emerson*". Esse experimento frustrou inicialmente os seus autores que não conseguiram explicar os resultados, mas eles forneceram as evidências essenciais em favor do conceito de que a fotossíntese é conduzida por dois sistemas fotoquímicos que diferem levemente em seus comprimentos de onda ótimos. Todavia, em 1961, um outro trabalho explicou os resultados encontrados por Emerson. *Duysens e colaboradores* demonstraram que quando uma amostra de alga vermelha era iluminada com luz de comprimento de onda longo, o citocromo tornava-se intensamente oxidado. Se uma luz de comprimento de onda curto era ligada ao mesmo tempo, o efeito de oxidação era parcialmente revertido (redução parcial). O desligamento dessa lâmpada

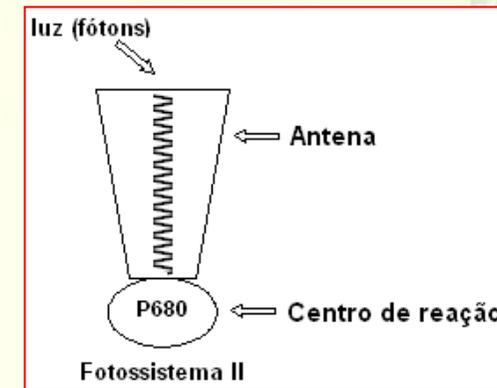
fazia com que a oxidação alcançasse novamente o seu nível máximo. O estado de redução total do citocromo somente era obtido com o desligamento da lâmpada vermelho-longo. Esse efeito antagonístico já havia sido explicado por *Hill e Bendall*, em 1960, onde esses pesquisadores prepuseram que o mecanismo fotossintético envolvia dois eventos: um que tendia a oxidar os citocromos e um que atua reduzindo esses transportadores de elétrons. Esses estudos levaram a estruturação do denominado esquema em "Z" = "Zig-Zag", ou "Reação de Hill", onde cada um dos componentes da Cadeia de Transporte de Elétrons da fotossíntese são distribuídos (plotados) de acordo com os seus Potenciais de oxido-redução (Em).

Atualmente, a existência de dois complexos protéicos pigmentados (*fotosistemas*) é amplamente aceita, sendo que um dos fotosistemas absorve, preferencialmente, luz na faixa de comprimento de onda mais curto (680 nm = fotosistema II) e o outro absorve, preferencialmente, radiação de comprimento de onda na região do vermelho-longo (fotosistema I), daí a explicação para o *Efeito Intensificador de Emerson* e o "*Red Drop*". Além disso, o *fotosistema II* produz um forte oxidante (P680) que é capaz de oxidar a molécula de água, enquanto o *fotosistema I* produz um forte redutor (P700⁺), capaz de reduzir o NADP⁺ a NADPH.

A estrutura básica dos fotosistemas é representada por proteínas e pela existência de um *complexo antena*, onde encontram-se os pigmentos, além do *centro de reação*, constituído por uma molécula de *clorofila a "especial"* que é, efetivamente, o único pigmento que participa da cadeia de transporte de elétrons. As antenas dos fotosistemas podem ser explicadas por analogia às antenas parabólicas das televisões, que captam e afunilam o sinal até os receptores. O sinal deve chegar numa forma conhecida (decodificada) e em intensidade adequada na periferia da antena para que ele possa ser transformado em imagem de qualidade na televisão. Caso o sinal tenha características desconhecidas ou seja fraco, o resultado será a ausência de imagens ou uma imagem muito ruim.

Assim sendo, a proposta atualmente aceita para a estruturação dos “*complexos antenas*” nos fotossistemas é que estes apresentam moléculas de carotenóides em sua periferia, uma vez que esses pigmentos absorvem preferencialmente as radiações de comprimentos de onda mais curtos, na faixa do azul-violeta, reduzindo os riscos de danos causados pelo excesso de energia. A energia absorvida por esses pigmentos é transferida às clorofilas, num processo de transferência de energia puramente físico, na forma de *ressonância*. Nesse tipo de transferência de energia, o simples fato de um pigmento apresentar afinidade ao outro pigmento possibilita que a excitação de um deles seja transferida ao outro. Uma analogia ao funcionamento desse processo de transferência física de excitação pode ser feita com a utilização de dois violões com a mesma afinação. Ao tocarmos as cordas de um deles e se aproximamos esse do outro, na mesma afinação, por ressonância, as cordas do segundo também vibram, como se tivessem sido tocadas. Isso acontece com os pigmentos nas antenas dos fotossistemas.

Uma vez que os fótons de radiação de determinadas energias são captados pelos pigmentos localizados na periferia das antenas (carotenóides), esses a transferem, por ressonância, para os pigmentos que estão próximos (outras moléculas de carotenóides e de clorofilas a e b). Caso esse fóton apresente energia adequada, por ressonância, molécula à molécula de pigmentos vão se tornando excitadas. Essa energia de excitação pode chegar, então, aos centros de reação dos fotossistemas, tornando essas moléculas de clorofila *a* especiais *inicialmente excitadas e, posteriormente, oxidadas*, fazendo com que a cadeia de transporte de elétrons entre em funcionamento. Caso a energia do fóton seja baixa, a excitação é perdida durante a transferência de energia entre os pigmentos da antena, não chegando até o centro de reação, o que não ativa o fluxo de elétrons na CTE. Em contraste, fótons com excesso de energia podem causar danos ao aparelho fotossintético (*foto-oxidação*), em decorrência da degradação de proteínas e de lipídios das membranas e de danos aos próprios pigmentos das antenas.



O processo fotoquímico da fotossíntese envolve a presença da luz, dos pigmentos (nos fotossistemas) e de outros dois complexos protéicos não pigmentados, o citocromo b_6/f e o $CF_0:CF_1$ -ATP sintase:

Fotossistema II (PSII):

O fotossistema II (PSII) foi identificado posteriormente ao fotossistema I, por isso tem essa denominação. O PSII apresenta o complexo antena (“*sistema coletor de luz*”) constituído por aproximadamente 250 moléculas de clorofila *a*/clorofila *b*, na proporção de 1/1. Além desses pigmentos, um número menor de moléculas de carotenóides complementam a estrutura da antena do PSII. O centro de reação desse fotossistema é formado por uma molécula de clorofila *a* especial, que apresenta pico máximo de absorção de luz em 680 nm (vermelho), sendo denominado P680. Associado ao PSII ocorre o Complexo de Evolução do Oxigênio (CEO), estrutura responsável pela fotoxidação (fotólise) das moléculas de água, liberando 4 hidrogênios, 4 elétrons e uma molécula de oxigênio, conforme a equação a seguir:



O funcionamento do CEO é de fundamental importância para a ativação da cadeia de transporte de elétrons (CTE), que permite a formação de ATP, coenzima fundamental à formação de açúcares no processo bioquímico, e para a liberação do oxigênio, possibilitando a vida em nosso planeta.

Fotossistema I (PSI):

O fotossistema I (PSI) foi descoberto primeiro que o PSII. O PSI também apresenta um complexo antena (“sistema coletor de luz”), sendo este constituído por aproximadamente 100 moléculas de clorofila a/clorofila b, na proporção de 4/1. Além desses pigmentos, um número menor de moléculas de carotenóides também complementam a estrutura da antena do PSI. O centro de reação desse fotossistema é formado por uma molécula de clorofila *a* especial, que apresenta pico máximo de absorção de luz em 700 nm (vermelho-longo), sendo denominado P700. Associado ao PSI encontra-se a proteína *ferredoxina NADP⁺-redutase*, responsável pela redução do NADP⁺ a NADPH, utilizando os elétrons que são transportados através da CTE. O NADPH é a principal substância responsável pela redução do CO₂ atmosférico em açúcar (gliceraldeído-3-fosfato = 3-PGAlD), durante o processo enzimático da fotossíntese.

Em plantas mantidas em ambientes ensolarados, a proporção entre os PSII e PSI é de 1,5/1. Essa proporção é reduzida em plantas mantidas sob sombreamento, tanto pelo aumento da quantidade de PSI, quanto pela redução na quantidade de PSII.

Citocromo b₆f:

A conexão entre esses fotossistemas é realizada pela participação de um terceiro complexo protéico, o citocromo b₆f. Esse complexo protéico não é pigmentado, sendo formado basicamente por essas duas proteínas de transportadoras de elétrons, o citocromo b₆ e o citocromo f. Associado a esse complexo existe o chamado *pool de plastoquinonas*, que permite o funcionamento da *bomba lançadeira de prótons*, sistema que aumenta o *gradiente de potencial eletroquímico* entre o *lúmen do tilacóide* e o *estroma*,

aumentando a produção de ATP através da *CF₀:CF₁-ATP sintase*. Além disso, é pelo citocromo b₆f que retornam os elétrons que atuam na fotofosforilação cíclica da fotossíntese, com veremos mais a frente.

A distribuição dos complexos protéicos nas membranas dos tilacóides obedece uma relação lógica, envolvendo os ambientes onde essas estruturas liberam os seus produtos. Assim, o PSII e o citocromo b₆f ocorrem tanto em regiões prensadas quanto nas regiões não prensadas dos tilacóides, ao passo que o PSI (NADPH ⇨ estroma) e o CF₀:CF₁-ATP sintase (ATP ⇨ estroma) ocorrem exclusivamente em regiões não prensadas dos tilacóides.

Esquema em “Z” (Zigue-Zague) e a Cadeia de Transporte de Elétrons:

Estudos realizados por Hill e Bendall, desde o final da década de 30, resultaram no estabelecimento de um esquema conhecido como “esquema em Z” ou “esquema de Hill e Bendall” ou, ainda, “Reação de Hill”, que explica o funcionamento da CTE de elétrons da fotossíntese e o processo denominado “*foto-fosforilação oxidativa*”. Pelo esquema, cada composto componente da CTE é distribuído (plotado), em sistema cartesiano, considerando os valores médios (metade oxidado e metade reduzido) de seus potenciais de oxido-redução (Em), expressos em unidade de voltagem (V ou mV). Quanto menor o valor do **Em**, maior é o *potencial de redução* (ou seja, de doação de elétrons) do composto em questão.

Na fotofosforilação oxidativa, a síntese de ATP está associada ao funcionamento da CTE, que permite a formação do gradiente de potencial eletroquímico. Esse processo envolve, inicialmente, a excitação dos pigmentos nas antenas dos fotossistemas. Essa excitação é transferida por *ressonância* de pigmento a pigmento, até o centro de reação, o que ativa o funcionamento da CTE. No PSII, a excitação chega até as moléculas do P680. Essa molécula, torna-se inicialmente excitada. Essa excitação resulta no distanciamento de seus elétrons do núcleo, o que faz com que elas tenham o seu potencial de oxido-redução (Em) alterado (ficando negativo),

provocando a sua *oxidação* (perda de elétrons), possibilitando a transferência de seus elétrons para moléculas de *feofitina* (moléculas de “clorofilas” nas quais os átomos de Mg^{++} do tetrapirrol são substituídos por H^+). Da feofitina, os elétrons são transferidos para as *quinonas* (Q_A e Q_B), que por sua vez os transferem ao *citocromo* b_6/f . Esse citocromo é a proteína transportadora de elétrons que faz a conexão entre os fotossistemas II e I. Através da reação de foto-oxidação da água (fotólise), apresentada anteriormente, os elétrons retirados das moléculas de clorofilas *a* especiais (P680) são repostos. Portanto, no FSII, as moléculas da P680 são as únicas que realmente sofrem reações redoxes, daí a sua denominação de *moléculas de clorofila a especiais*. As demais moléculas de clorofila *a* e dos demais pigmentos, quando se oxidam, são destruídas, não sendo possível a sua regeneração.

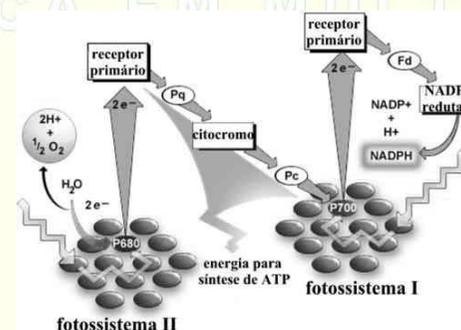
No Fotossistema I ocorre a mesma excitação dos pigmentos da antena (por *ressonância*) até o centro de reação, que, todavia, apresenta o pico máximo de absorção de energia em 700 nm (P700). A P700, quando excitada, tem o seu potencial de oxido-redução (**Em**) também alterado (ficando negativo), provocando a sua *oxidação* (perda de elétrons), possibilitando a transferência de seus elétrons para diversas moléculas intermediárias componentes da cadeia transportadora de elétrons, sendo o último componente a receber os elétrons as moléculas de *ferredoxina NADP⁺-redutase*, enzima que permite a redução do **NADP⁺** a **NADPH**. Os elétrons removidos da molécula P700 são repostos pelos elétrons provenientes do fotossistema II, através da *plastocianina* (PC). Na verdade, em última análise, os elétrons que são transportados através da CTE são **todos** provenientes da **água**, sendo esta molécula considerada o **agente redutor** da CTE da fotossíntese. Em contraste, a **NADP⁺** é o **agente oxidante** da CTE da fotossíntese.

O funcionamento da CTE e a foto-oxidação da água resultam na produção de ATP (fosforilação oxidativa) e de NADPH, duas moléculas essenciais ao processo enzimático da fotossíntese. A fosforilação oxidativa pode ser *cíclica* ou *não-cíclica*. No primeiro caso, o PSI pode trabalhar independentemente do PSII. Neste processo, os elétrons energizados da P700, ao invés de serem transportados para o NADP⁺, voltam para o citocromo b_6/f , reforçando o

gradiente de potencial eletroquímico, que pode resultar no aumento na produção de ATP. Entretanto, a produção de NADPH não se verifica. Essa situação pode ocorrer em condições de deficiência de CO₂ internamente, devido ao fechamento estomático, que ocorre em resposta aos estresses hídricos. Nessa condição, podem faltar moléculas de NADP⁺, podendo os elétrons ser doados ao O₂, o que resulta na *formação de radicais livres*. Em contraste, quando os elétrons fluem diretamente da água, através dos fotossistemas II, citocromo b_6/f e fotossistema I, até a NADP⁺ produzindo a NADPH, esse fluxo é unidirecional, sendo denominado de *fluxo acíclico*, produzindo tanto o poder redutor (NADPH) quanto o ATP.

CF₀:CF₁-ATP-sintetase :

O processo de fosforilação oxidativa ocorre envolvendo o *acoplamento quimiosmótico* (Teoria Quimiosmótica de Mitchell), onde o fluxo de elétrons através da CTE é o responsável pela construção do gradiente de potencial eletroquímico entre o lúmen do tilacóide e o estroma do cloroplasto. Como na respiração, a dissipação desse gradiente se dá através do complexo *CF₀:CF₁-ATP-sintetase*, que está inserido na membrana do tilacóide (pela porção CF₀), com a porção CF₁ imersa no estroma. A estrutura da *CF₀:CF₁-ATP-sintetase* apresenta um canal através do qual, prótons podem fluir, a favor do gradiente, de volta para o estroma do cloroplasto. A energia potencial da dissipação do gradiente é utilizada como força motriz para a síntese de ATP a partir de ADP e Pi. Para cada 3 H⁺ que retornam, 1 molécula de ATP é produzida.



Os mecanismos envolvidos na formação do gradiente de potencial eletroquímico envolvem a ativação do funcionamento da CTE, que em última análise está relacionado à qualidade e à intensidade de radiação que chega até as antenas nos fotossistemas. A qualidade da radiação fornecida pode ter efeito direto na eficiência de funcionamento da CTE. As radiações *azul-violeta* e *vermelha-vermelho-longo* são as mais eficientes para a promoção da fotossíntese. Todavia, a radiação vermelha apresenta maior eficiência que a azul, uma vez que a excitação provocada por essa radiação faz com que a excitação dos elétrons nos pigmentos da periferia da antena alcance níveis que permitem a transferência imediata da energia de excitação (por *ressonância*) ao pigmento que se encontra mais próximo, alcançando o centro de reação. Em contraste, para a radiação na faixa do azul, é necessária uma perda inicial da energia na forma de *calor*, antes que seja possível a transferência de excitação por ressonância. Parte da energia de cada fóton, independente da sua energia (cor = faixa do espectro = comprimento de onda), sempre é dissipada na forma de calor, sendo uma outra parte dessa energia dissipada na forma de *fluorescência*, emitida na região do vermelho pelas moléculas de clorofilas. Esse processo de *fluorescência* consiste na *emissão de radiação em comprimento de onda maior que o recebido*. Atualmente, a medição da fluorescência tem sido utilizada na detecção da ocorrência de estresses de diferentes origens. A fluorescência é uma medida de *eficiência fotoquímica*, ou seja, da eficiência como que os *fótons absorvidos pela antena são convertidos em poder redutor (NADPH)*. A determinação da fluorescência é obtida com a utilização de equipamentos denominados *fluorímetros*, sendo que, normalmente, a eficiência fotoquímica é reduzida quando as plantas são submetidas a condições de estresses.

Fase Bioquímica:

A principal função do processo ou fase fotoquímica da fotossíntese é transformar a energia luminosa em energia química (ATP e NADPH₂). Essas duas moléculas são, então, utilizadas para a transformação do CO₂ atmosférico em açúcares, principais combustíveis da respiração.

O processo envolvido nessa transformação foi descoberto por um grupo de pesquisadores liderados por Melvin Calvin, que desde 1950 começaram a desenvolver trabalhos relacionados à fotossíntese. Os estudos desenvolvidos por Calvin & Benson resultaram na identificação de um ciclo conhecido como Ciclo de Redução do Carbono Fotossintético (Ciclo de Calvin ou Ciclo C₃). A elucidação desse ciclo deu a Calvin o Prêmio Nobel de Química no ano de 1961.

Ciclo de Calvin = Ciclo C₃:

O Ciclo C₃ ocorre universalmente nas plantas, ou seja, todas as plantas são em última análise *plantas C₃*, uma vez que esse é o único Ciclo que permite a transformação do CO₂ em açúcares. Os demais Ciclos (bombeamento de CO₂/carbonato, C₄ ou CAM) são adaptações a condições ambientais especiais, geralmente relacionadas à redução na disponibilidade de água e ao aumento da temperatura ambiental (nos dois últimos ciclos). Esses Ciclos serão discutidos posteriormente ao C₃.

A primeira questão a ser respondida por Calvin foi como o CO₂ atmosférico era incorporado nos tecidos das plantas? Esse CO₂ precisa se difundir do lado externo da folha, através dos estômatos e das câmaras sub-estomáticas, atravessando membranas (plasmática e as duas do envelope do cloroplasto) até chegar ao estroma, local onde as enzimas e os intermediários do Ciclo possibilitam a conversão de CO₂ em açúcares simples. Calvin e seus colaboradores trabalharam com uma espécie de alga do gênero *Chlorella*. As algas eram mantidas em recipiente transparente contendo água, sendo iluminadas com uma lâmpada incandescente. Então, CO₂ marcado com carbono 14 (¹⁴CO₂) era injetado no interior do recipiente. Após algum tempo a torneira do recipiente contendo as algas era aberta, sendo a solução coletada em etanol fervente. O material contido no etanol era avaliado por cromatografia em papel, através de auto-radiografia, utilizando padrões conhecidos para a comparação. As principais substâncias encontradas nessas exposições ao ¹⁴CO₂ eram *ácidos orgânicos*. Quando os tempos de exposição ao ¹⁴CO₂ e de abertura da

torneira se tornaram bastante curtos (± 5 segundos), uma mancha principal e mais concentrada era sempre predominante. Pela comparação com os padrões conhecidos essa mancha foi identificada como sendo correspondente ao *ácido fosfoglicérico* (APG), um composto que apresenta *três carbonos* em sua molécula. Esse ácido foi considerado a primeira a substância estável do Ciclo de Redução do Carbono na Fotossíntese e, por apresentar três carbonos, esse Ciclo passou a ser denominado *Ciclo C₃*. Estudos posteriores mostraram que no Ciclo de Calvin, o APG sempre é o primeiro produto estável formado, independente da espécie de planta analisada.

Após a identificação do APG, a primeira questão levantada foi relacionada à identificação da substância que combinada com o CO₂ origina o APG. Por uma questão lógica, inicialmente foi buscada uma substância presente nos cloroplastos contendo *dois carbonos* na sua molécula. Todavia, tal substância nunca foi encontrada. Ao contrário, uma substância solúvel no estroma contendo *cinco carbonos* estava sempre presente, sendo identificada como *Ribulose 1,5-bisfosfato* (RuBP), o que resultou na compreensão dos mecanismos de produção do APG. A explicação do processo depende da concepção de que a condensação do CO₂ à RuBP resulta na produção de uma *molécula intermediária e instável* contendo *seis carbonos* (*2-carboxi-3-cetoarabinitol-1,5-bisfosfato*). Imediatamente a sua formação, essa molécula é quebrada em *duas* moléculas de APG, sendo que apenas uma delas é radioativa (quando se utiliza ¹⁴CO₂). Esses fatos elucidaram a *primeira etapa* do Ciclo de Calvin, a *carboxilação* da RuBP pelo CO₂. A catalise enzimática dessa reação foi atribuída inicialmente à enzima *Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase* (RuBPCase), uma vez que acreditava-se que a RuBP poderia se combinar apenas com CO₂. Posteriormente, descobriu-se que tal enzima também pode catalisar a oxigenação da RuBP, na primeira reação do *Ciclo Fotorrespiratório*, que discutiremos mais adiante. Em decorrência de atuar como *carboxilase* e como *oxigenase*, a *RuBPCase* passou a ser denominada *Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase*, sendo identificada pela sigla RUBISCO. A RUBISCO é considerada a proteína mais abundante das folhas, alcançando um percentual de até 40% do total. Essa enzima, apesar de ser uma carboxilase/oxigenase

apresenta maior afinidade por carbono, sendo a relação 3/1 de carboxilação/oxigenação observada em atmosfera normal (0,035% de CO₂ e 21% de O₂). A RUBISCO é uma enzima solúvel no estroma do cloroplasto. A sua ativação é estimulada por CO₂, Mg²⁺ e por pH básico, sendo esse último fator decorrente da fase fotoquímica (formação do gradiente de potencial eletroquímico entre o estroma e o lúmen do tilacóide).

Após a etapa de carboxilação tem início a segunda etapa do Ciclo de Calvin: a *redução*. Nessa etapa, as moléculas de APG formadas durante a carboxilação são inicialmente *fosforiladas*, utilizando o ATP produzido na *fase fotoquímica* e, posteriormente *reduzidas*, utilizando-se o NADPH₂, também formada na fase fotoquímica. O produto final dessa etapa é uma triose fosfatada, o *gliceraldeído 3-fosfato* (3PGAld). O carbono presente no CO₂ é a forma mais oxidada que se conhece na natureza (+4). O carbono do APG é um pouco mais reduzido (+3), enquanto o carbono do 3PGAld é mais reduzido ainda (+1). A transformação de um *ácido* (APG) em um *aldeído* (3PGAld) é um *processo de redução* (os aldeídos sempre são mais reduzidos que os ácidos). O 3PGAld é considerado o *primeiro açúcar* formado em *qualquer planta* (C₃, C₄ ou CAM), uma vez que o Ciclo de Calvin é o Ciclo responsável pela transformação do CO₂ em açúcares em qualquer que seja a planta. Lembramos, ainda, que os açúcares são sempre ou *aldeídos* ou *cetonas*, sendo que o próprio 3PGAld pode originar, por isomerização, uma cetona (*dihidroxi acetona fosfato* = DHAP).

A última etapa do Ciclo de Calvin é a *regeneração* da RuBP. Tal fato é fundamental para o funcionamento do Ciclo. De cada seis moléculas de CO₂ incorporadas à RuBP, apenas uma pequena fração (1/6) originam carboidratos mais complexos (sacarose, glicose, frutose, amido, celulose, etc.). A maior parte dessa fração de carbonos fixados é transformada em sacarose, a principal forma de açúcares transportada através do floema, ou em amido, a principal forma de carboidratos armazenada nas plantas. O amido produzido em decorrência da fotossíntese é armazenado no próprio estroma dos cloroplastos (amido primário), local onde é sintetizado. Em contraste, em função de sua natureza osmótica, a sacarose não pode ser

sintetizada e nem armazenada no cloroplasto, pois causaria a sua ruptura em decorrência da absorção de água. Essa substância é sintetizada no citosol. A maioria dos carbonos (5/6), entretanto, são utilizados para a regeneração da RuBP. Nessa etapa, vários intermediários com diferentes números de carbono são produzidos (xilulose, ribulose, sedo-heptulose, etc), tendo como produto final a RuBP. Parte dos ATPs produzidos na fase fotoquímica também são consumidos nesse processo de regeneração. Embora a glicose seja normalmente representada como o produto final da fotossíntese, na realidade pouca glicose livre é produzida nas células fotossintetizantes, sendo a sacarose o principal carboidrato sintetizado.

Como dissemos, o Ciclo C_3 foi, inicialmente, considerado universal. Todavia, estudos posteriores mostraram que ele apresenta limitações, que estão diretamente relacionadas à característica de funcionamento da RUBISCO também como uma oxigenase. Trabalhos desenvolvidos por Otto Warburg, demonstraram que quando plantas C_3 são cultivadas em atmosfera enriquecida com O_2 (concentração superior aos 21% normais da atmosfera), a taxa fotossintética é reduzida, sendo observado a perda de parte dos carbonos que foram incorporados em presença de luz (fato conhecido como *Efeito Warburg*), fenômeno contrário aos objetivos da fotossíntese. Esse fato foi posteriormente explicado pela atuação da RUBISCO como oxigenase, passando a ser denominado *fotorrespiração*.

A *fotorrespiração* resulta na perda líquida de 25% dos carbonos incorporados (CO_2) em presença de luz, o que ocorre através dos estômatos. A explicação para esse processo tem início com a oxigenação de moléculas de RuBP, catalisada pela RUBISCO. Os produtos dessa reação são uma molécula de APG (3C) e uma molécula de ácido fosfoglicólico (*APGlicólico*), que apresenta dois carbonos em sua estrutura. Em função do número de carbonos do *APGlicólico*, esse ciclo é denominado Ciclo C_2 . A *fotorrespiração* ocorre com a participação de 3 organelas: os *cloroplastos*, os *peroxissomos* e as *mitocôndrias*. Após a formação do *APGlicólico*, nos *cloroplastos*, ele sofre duas transformações, que resulta na produção do *glicolato* que, por sua vez, é transportado para os *peroxissomos*. Nessa organela o *glicolato* é transformado

em *glioxilato*, numa reação que gera a produção de H_2O_2 , substância tóxica no metabolismo. Todavia, tal substância é rapidamente quebrada a O_2 e H_2O pela ação da enzima *catalase*, presente em grande quantidade nos peroxissomos. O *glioxilato* formado é transformado em *glicina*, numa reação de *transaminação*. Esse aminoácido é, então, transportado para o interior das mitocôndrias. Nessa organela, numa reação que envolve a formação de *serina*, é liberada uma molécula de CO_2 , exatamente a molécula perdida para a atmosfera através dos estômatos. A *serina* é transportada de volta para os *peroxissomos* originando, após duas reações, o *glicerato*, que por sua vez é transportado para o interior dos *cloroplastos*. Esse *glicerato* é fosforilado, originando o APG, fechando o Ciclo. Como o APG apresenta 3C e o *APGlicólico* possui apenas 2C e, ainda, como uma molécula de CO_2 está sendo perdida, pela estequiometria, são necessárias 2 moléculas de *APGlicólico* para que o Ciclo inicie. Portanto, entram no Ciclo Fotorrespiratório 4 C, perde-se 1C e retornam 3C, o que resulta numa perda total de 25% dos carbonos.

A primeira questão que surge dessa conclusão é porque tal fato ocorre em sentido contrário à lógica da fotossíntese? Outra questão envolve as funções desse Ciclo. As repostas prováveis giram em torno de análises seguras e também de especulações. O primeiro fato claro é que a *fotorrespiração* tem sua origem bioquímica na atuação da RUBISCO como oxigenase. Então uma outra questão se coloca. Por que essa enzima atua dessa forma? Uma análise menos aprofundada sugere que o comportamento dessa enzima é decorrente da sua *não evolução paralela* às alterações na composição gasosa da atmosfera terrestre atual, especialmente de CO_2 e de O_2 , que modificaram em relação à atmosférica primitiva. A atmosfera primitiva continha muito mais CO_2 e muito menos O_2 que a atual (0,035% de CO_2 e 21% de O_2), o que provavelmente não trazia problemas para a fotossíntese dessas plantas, uma vez que a RUBISCO atuava quase que exclusivamente como carboxilase. Todavia, esse comportamento e essa manutenção da atividade de oxigenase da RUBISCO têm uma explicação lógica, mas não totalmente aceita. Quando

as plantas são submetidas a condições de estresse hídrico, o primeiro fenômeno observado é o fechamento estomático. A consequência é que a concentração de CO_2 (concentração interna na folha) nos sítios de carboxilação da RUBISCO cai extremamente. Em decorrência disso, começam a sobrar moléculas de ATP e de NADPH_2 , e a faltar moléculas de NADP^+ , uma vez que não há CO_2 suficiente para ser reduzido. O resultado é que os elétrons, que fluem através da CTE da fotossíntese (continua a ser estimulada pela radiação luminosa, geralmente elevada em condições de estresse hídrico) passam a ser doados a outros agentes oxidados, como ao O_2 , podendo resultar na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROs são radicais livres que degradam a estrutura dos cloroplastos, podendo causar danos irreversíveis ao aparelho fotossintético. Portanto, a existência do Ciclo Fotorrespiratório seria um mecanismo de proteção contra esses danos, uma vez que ele permite a recirculação de carbono (CO_2) internamente nas folhas, reduzindo os danos causados pelo excesso de radiação.

As plantas C_3 apresentam o fenômeno de fotorrespiração mesmo em atmosfera normal e com disponibilidade adequada de água. Embora os analistas mais otimistas encarem esse processo como um mecanismo capaz de recuperar 75% dos carbonos que entram no Ciclo, evitando a perda total, os 25% dos carbonos perdidos (que em condições normais não impedem o desenvolvimento completo da planta) podem ser minimizados com o enriquecimento da atmosfera com CO_2 , mostrando que a fotorrespiração reduz o rendimento das plantas C_3 . As plantas C_3 , em decorrência desse “problema”, são plantas tipicamente de ambientes com temperaturas amenas (ótimo 25°C) e com disponibilidade elevada de água, tendo o seu rendimento muito reduzido em condições adversas. Isso ocorre, exatamente, em decorrência do aumento da fotorrespiração, devido à solubilidade do CO_2 ser mais reduzida que a do O_2 com o aumento da temperatura. Consequentemente, a RUBISCO aumenta a sua atuação como oxigenase.

Um tema muito atual é o aquecimento global e o aumento no efeito estufa, que estão associados ao *Protocolo de Kyoto* (redução na emissão de carbono na atmosfera) e ao “Mecanismo de Desenvolvimento Limpo”, bem

como aos “Programas de Créditos de Carbono” (“Seqüestro de Carbono”). O aquecimento global está diretamente associado ao aumento da emissão de CO_2 na atmosfera. Como os aumentos na temperatura não são tão intensos, sob o ponto de vista da fotossíntese, as plantas C_3 se beneficiam muito desse aumento, uma vez que a fotorrespiração é reduzida em resposta ao aumento na disponibilidade de CO_2 .

O Programa de Crédito de Carbono é exatamente o que preconiza o Mecanismo de Desenvolvimento Limpo. Os países que poluem muito podem investir, em países que poluem menos, em programas que buscam a redução na emissão de CO_2 para a atmosfera ou que incorporam carbonos. O Brasil pode lucrar com isso, uma vez que as florestas tropicais (as árvores são C_3) são as que potencialmente mais incorporam CO_2 , reduzindo a sua disponibilidade na atmosfera. Todavia, como o carbono é apenas “sequestrado”, as queimadas que, em contraste, liberam esse carbono para a atmosfera, colocam o Brasil em evidência como um dos países que mais polui e que mais contribui para o aumento do efeito estufa.

Como exemplo de plantas C_3 , podemos incluir diversas espécies, dentre as quais o feijão, a soja, o algodão, quase 100% das espécies arbóreas e as gramíneas típicas de clima frio, como o trigo e o arroz, por exemplo. Estudos realizados em ambientes controlados (estufas) mostram que o enriquecimento da atmosfera com CO_2 (até a concentração de 2%) aumenta a produtividade dessas plantas em mais de 20%, o que demonstra ser a fotorrespiração economicamente prejudicial. Esse aumento no rendimento decorre exatamente da atuação da RUBISCO quase que totalmente como carboxilase, reduzindo as proporções de redução na produtividade decorrentes de sua atuação como oxigenase, evitando ou minimizando a fotorrespiração.

Inicialmente acreditava-se que o único mecanismo fotossintético existente em plantas fosse o C_3 . Todavia, estudos demonstraram que as plantas apresentam mecanismos complementares ao C_3 , sendo essas adaptações fisiológicas que visam exatamente eliminar e/ou minimizar as

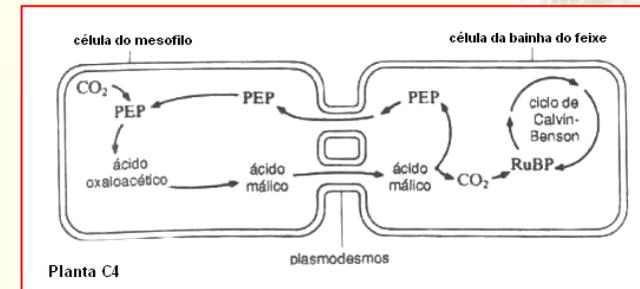
desvantagens da fotorrespiração. Até o momento, três diferentes mecanismos que limitam a fotorrespiração são conhecidos.

a) Bombeamento Ativo de CO_2 e HCO_3^- :

Organismos marinhos (algas e cianobactérias) e plantas aquáticas submersas (*Elodea canadensis*, p.ex.) têm a capacidade de transportar para o interior de suas células o CO_2 e o HCO_3^- dissolvidos na água, o que ocorre através de bombeamento ativo, com gasto de ATP (produzido pela fase fotoquímica da fotossíntese). A ação dessas bombas somente é ativada em atmosfera com concentração reduzida de CO_2 . O HCO_3^- acumulado internamente é convertido em CO_2 pela ação da enzima *anidrase carbônica* (AC), aumentando a concentração interna de CO_2 , que pode atingir até 50 mM. Essa concentração elevada de CO_2 faz com que a RUBISCO atue basicamente como carboxilase, eliminando quase que completamente a fotorrespiração.

b) Ciclo C_4 ou Ciclo de Hatch e Slack:

A partir de trabalhos preliminares realizados com a utilização de $^{14}\text{C}_4$ em plantas de cana-de-açúcar (H.P. Kotshack e colaboradores, Hawaii, USA) e de milho (Y. Karpilov e colaboradores, Rússia), foi observado que, ao contrário do que se observava em plantas C_3 , o primeiro produto estável formado na fotossíntese dessas plantas apresentava quatro carbonos. Hatch e Slack, em 1966 elucidaram o Ciclo hoje denominado C_4 , com a publicação do trabalho intitulado "Fotossíntese em folhas de cana-de-açúcar: uma nova reação de carboxilação e uma via de formação de açúcar". Nesse trabalho foram apresentadas algumas características marcantes observadas em plantas C_4 . Uma característica importante das plantas C_4 é a ocorrência de uma anatomia especial, que possibilita a separação das células das folhas em células do mesofilo e em uma estrutura conhecida como células da bainha dos feixes vasculares (anatomia *Kranz*, palavra alemã que significa *halo* ou *concêntrica*), embora existam poucos relatos da ocorrência dessa via em plantas sem apresentação da anatomia Kranz.



Hatch e Slack demonstraram que o Ciclo C_4 ocorre em quatro etapas. Na primeira etapa, de *carboxilação*, o CO_2 , ou mais precisamente, o carbonato (HCO_3^-) formado pela enzima anidrase carbônica (AC), combina-se, no citossol, com um composto de três carbonos, o *fosfoenolpiruvato* (PEP), originando um *ácido orgânico* de quatro carbonos, o *ácido oxalacético*. Essa reação é catalisada por uma enzima citossólica, a *PEPcase*, enzima esta que ao contrário da RUBISCO, atua apenas como carboxilase e apresenta elevada afinidade por carbonato. O ácido oxalacético é rapidamente transformado em dois outros ácidos orgânicos: *malato* **ou** *aspartato*. Tem início, então, a segunda etapa do Ciclo: o *transporte*, onde **um desses ácidos** é conduzido para as células da bainha, o que ocorre via conexões plasmodesmáticas, observadas em grande número nas células localizadas na divisa entre as células do mesofilo e da bainha. Nas células da bainha ocorre a *descarboxilação* do ácido orgânico transportado, na *terceira etapa* do processo. O CO_2 liberado nas células da bainha é incorporado à RuBP pela ação da RUBISCO, que em função da quantidade de CO_2 gerado durante a descarboxilação, atua quase que exclusivamente como uma carboxilase. Nessas plantas, portanto, o primeiro açúcar formado também será o *3PGAld*, mostrando que, como comentamos, em essência, todas as plantas são C_3 . Por sua vez, o ácido ou a substância de três carbonos formada após a descarboxilação é transportado de volta às células do mesofilo na quarta e última etapa do processo de fotossíntese C_4 , a *regeneração* do PEP. Além do fato da concentração das células do mesofilo com CO_2 reduzir a atuação da

RUBISCO como oxigenase, mesmo que alguma fotorrespiração ocorra, o CO₂ que seria perdido através dos estômatos é recapturado pela elevada eficiência de carboxilação da PEPcase. Portanto, as plantas C₄ não apresentam fotorrespiração aparente (detectável pelos métodos de trocas gasosas), embora sob o ponto de vista bioquímico ela possa ocorrer, não resultando, todavia, em perda líquida de carbonos em presença de luz.

Existem plantas que transportam *malato* e outras que transportam *aspartato* para as células da bainha. Além disso, as enzimas que atuam na *descarboxilação* dos ácidos de quatro carbonos nas células da bainha são específicas, o mesmo ocorrendo com o ácido orgânico ou com a substância de *três carbonos* que *retorna ao mesofilo*. O quadro abaixo resume o que ocorre em três grupos de plantas C₄.

Portanto, no Ciclo C₄, há uma *separação espacial* entre a *assimilação* e a *incorporação* do carbono e a sua *carboxilação* através do Ciclo de Calvin, sendo a *primeira mesofilica* e a *segunda* característica das *células da bainha*, o que resulta praticamente, no desaparecimento da fotorrespiração e no aumento da eficiência fotossintética dessas plantas em ambientes com temperatura mais elevada e secos. Todavia, esse mecanismo de concentração de carbono nas células da bainha apresenta uma elevação no custo energético.

Principal ácido de 4C transportado para as células da bainha:	Enzima de descarboxilação:	Local da descarboxilação	Principal ácido ou substância de 3C que retorna às células do mesofilo:	Exemplo de planta:
Malato	Enzima málica dependente de NADP (EM-NADP)	(cloroplasto)	Piruvato	Milho, cana-de-açúcar, sorgo
Aspartato	Enzima málica dependente de NAD (EM-NAD)	(mitocôndria)	Alanina	Mileto, <i>Panicum</i>
Aspartato	Fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEP-CK)	(citoplasma)	Alanina/piruvato	<i>Panicum maximum</i>

A relação entre a quantidade de ATP e de NADPH₂ consumidos por molécula de CO₂ incorporada em plantas C₃ e C₄ é apresentada a seguir:

Tipo de planta:	CO ₂	ATP	NADPH ₂
<i>Plantas C₃</i>	1	3	2
<i>Plantas C₄</i>	1	5	2

Como se observa, a concentração de CO₂ nas células da bainha, possibilitada pelo mecanismo C₄, resulta num aumento no consumo de 2 ATPs a mais que nas plantas C₃. Tal fato implica em as plantas C₄ apresentar uma fotossíntese mais intensa que as C₃, o que, de fato, ocorre, especialmente em ambientes com temperaturas elevadas (ótimo de 35°C) e com reduzida disponibilidade de água e alta luminosidade. Em ambientes frios e sombreados, as plantas C₃ apresentam maior eficiência que as C₄ em decorrência do seu menor consumo energético (ATP) e do seu baixo ponto de compensação luminoso.

Descoberto em gramíneas tropicais como o milho e a cana-de-açúcar, o ciclo C₄ ocorre sabidamente em 16 famílias, tanto de mono quanto de dicotiledôneas, sendo proeminente em Poaceae (milho, cana, mileto, sorgo, *Panicum*), Chenopodiaceae (*Atriplex*) e Cyperaceae. Em espécies arbóreas o único relato de planta C₄ existente é restrito a uma Euphorbiaceae (*Euphorbia forbesii*). Aproximadamente, cerca de 1% de todas as espécies conhecidas são C₄.

Os quadros a seguir apresentam, respectivamente, uma comparação entre plantas C₃ e C₄ e exemplos de plantas nono- e eudicotiledôneas que apresentam esses mecanismos.

Características diferenciais entre plantas C₃ e plantas C₄:

Processo	Plantas C ₃	Plantas C ₄
1. Fotorrespiração:	Presente: 25 a 30% do valor da FS	Presente: não mensurável pelos métodos de trocas gasosas
2. Primeiro produto estável:	Ácido fosfoglicérico (3C)	Ácido oxalacético (4C)
3. Ponto de Compensação de CO ₂ :	Alto: 50-150 ppm de CO ₂	Baixo: 0-10 ppm de CO ₂
4. Anatomia foliar:	Ausência de bainha vascular; quando presente não contém cloroplastos.	Diferenciação de células do mesofilo e bainha vascular contendo cloroplastos (existem exceções)
5. Enzima primária de carboxilação:	RUBISCO (Km ≈ 20 μM)	PEP-carboxilase (Km ≈ 5 μM)
6. Efeitos do oxigênio (21%) sobre a fotossíntese:	Inibição	Sem efeito
7. Fotossíntese versus intensidade de luz:	Satura em ≈ 1/3 da radiação solar máxima	Satura somente em radiação solar elevada
8. Temperatura ótima para a fotossíntese:	≈ 25°C	≈ 35°C
9. Taxa de fotossíntese líquida em condições de saturação luminosa:	15-35 mg CO ₂ incorporado dm ⁻² de folha h ⁻¹	40-80 mg CO ₂ incorporado dm ⁻² de folha h ⁻¹
10. Consumo de água para produção de matéria seca:	450-1000 g de H ₂ O g ⁻¹ de peso seco	250-350 g de H ₂ O g ⁻¹ de peso seco
11. Conteúdo de nitrogênio na folha para atingir fotossíntese máxima:	6,5-7,5% do peso seco	3,0-4,5% do peso seco

Relação de Espécies Monocotiledôneas e Eudicotiledôneas (C₃ ou C₄):

Monocotiledôneas – C ₄ :	Monocotiledônea - C ₃ :
Cyperaceae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cyperus esculentus</i> L. - <i>Cyperus rotundus</i> L. (Tiririca) 	Cyperaceae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cyperus alternifolium gracillis</i> L.
Aristidoideae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Aristida purpurea</i> Nutt. 	Graminae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Andropogon repens</i> (L.) Beauv. - <i>Agrotis alba</i> L. - <i>Avena sativa</i> L. (Aveia) - <i>Hordeum vulgare</i> L. (Cevada) - <i>Oryza sativa</i> L. (Arroz) - <i>Panicum commutatum</i> Schult. - <i>Poa pratensis</i> L. (grama azul) - <i>Triticum aestivum</i> L. (Trigo)
Eragrostoideae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Chloris gayana</i> Kunth (Capim-rhodes) - <i>Cynodon dactylum</i> (L.) Pers. (Grama Bermudas) - <i>Eragrotis pilosa</i> (L.) Beauv. 	
Panicoideae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Andropogon scoparius</i> Michx. - <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop. - <i>Panicum antidotale</i> Retz. - <i>Panicum capillare</i> L. - <i>Paspalum notatum</i> Flügge - <i>Pennisetum purpureum</i> Schum. (Capim-gordura) - <i>Saccharum officinarum</i> L. (Cana-de-açúcar) - <i>Setaria italica</i> (L.) Beauv. - <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench. (Sorgo) - <i>Zea Mays</i> L. (Milho) 	
Eudicotiledônea – C₄: <ul style="list-style-type: none"> - Amaranthaceae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Amaranthus albus</i> L. - <i>Atriplex rosea</i> L. - <i>Gomphrena globosa</i> L. - Euphorbiaceae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Euphorbia maculata</i> L. - <i>Euphorbia phorbessii</i> L. - Portulacaceae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Portulaca oleraceae</i> L. 	Eudicotiledôneas - C₃: <ul style="list-style-type: none"> - Chenopodiaceae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Atriplex hastata</i> L. - <i>Beta vulgaris</i> L. (Beterraba) - <i>Chenopodium album</i> L. - <i>Spinacea oleraceae</i> L. (Espinafre) - Cruciferae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Brassica nigra</i> (L.) Koch. (Mostarda) - Compositae: <ul style="list-style-type: none"> - <i>Helianthus annus</i> L. (Girassol)

- *Lactuca sativa* L. (Alface)

- *Xanthium strumarium* L.

Leguminosae:

- *Arachis hypogea* L. (Amendoim)

- *Glycine max* (L.) Merrill (Soja)

- *Phaseolus vulgaris* L. (Feijão)

Malvaceae:

- *Gossypium hirsutum* L. (Algodão)

Solanaceae:

- *Datura stramonium* L.

Umbelliferae:

- *Daucus carota* L. (Cenoura)

Metabolismo Ácido das Crassuláceas (MAC ou CAM):

Um mecanismo bastante interessante de fotossíntese foi descoberto em plantas da família das Crassulaceae, onde a grande maioria das espécies apresenta tecidos suculentos. Essas plantas tipicamente são de regiões quentes e com baixa frequência de chuvas (até desérticas), mostrando uma elevada tolerância à seca. O mecanismo fotossintético CAM também é observado em plantas de outras famílias como nas Bromeliaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Cactaceae, Euphorbiaceae e Portulacaceae (quando mantidas em ambientes secos e quentes).

Estudos envolvendo plantas dessas famílias demonstraram que, em decorrência do ambiente muito seco e quente, elas não podem abrir estômatos durante o dia, pois sofreriam dessecação completa. Em decorrência disso, essas plantas desenvolveram um mecanismo em que elas *captam o CO₂ atmosférico à noite, armazenando-o no vacúolo* na forma de *ácido málico*. Esse fato resulta na acidificação dos tecidos dessas plantas, daí a denominação do Ciclo de *Metabolismo Ácido das Crassuláceas*. No dia subsequente, elas promovem a *descarboxilação* do malato, liberando o CO₂ internamente, concentrando o ambiente em CO₂. Como os estômatos estão fechados, e nessas plantas o fechamento é muito eficiente (condutância estomática é zero), o CO₂ não é perdido mesmo que a RUBISCO atue como oxigenase. Portanto, essas plantas, de modo similar às C₄, também não apresentam fotorrespiração aparente. A

incorporação do carbono à noite, de modo similar às plantas C₄, também envolve a *carboxilação* do fosfoenolpiruvato (PEP) pelo CO₂, ou, mais precisamente, pelo carbonato (HCO₃⁻), o que ocorre no citossol com a participação da *PEPcase*, originando o *ácido oxalacético*. Esse por sua vez é transformado em *malato*, que é armazenado no *vacúolo* na forma de *ácido málico*. No dia seguinte, o ácido málico é transportado para fora do vacúolo, sendo, então, descarboxilado pela *EM-NADP* nos *cloroplastos*. O CO₂ liberado é incorporado à RuBP pela ação da RUBISCO, que atua praticamente como uma carboxilase exclusiva, devido a elevada concentração de CO₂ gerada internamente nos tecidos das plantas.

Nas plantas CAM o que se observa, portanto, é uma *separação temporal* entre a *assimilação do carbono*, que ocorre *à noite*, e a sua *fixação* que ocorre *durante o dia* através do *Ciclo de Calvin*, resultando, também, na produção do 3PGAld como primeiro açúcar formado, sendo as plantas CAM como as C₄, portanto, plantas C₃, em sua essência. Além disso, quando bem irrigadas e cultivadas em temperaturas amenas, as plantas CAM funcionam exatamente como uma planta C₃, abrindo os seus estômatos durante o dia e realizando fotossíntese com a participação direta da RUBISCO, dispensando a separação temporal dos processos e, portanto, apresentando fotorrespiração aparente.

Não há um mecanismo fotossintético (C₃, C₄ ou CAM) mais eficiente que outro, pois a eficiência de cada um deles depende diretamente do ambiente onde as respectivas espécies vegetais estão sendo cultivadas ou mantidas.

Discriminação Isotópica do Carbono:

O CO₂ atmosférico contém isótopos de carbono ¹²C, ¹³C e ¹⁴C, que ocorrem naturalmente nas proporções 98,9; 1,1 e 10⁻¹⁰%, respectivamente. A forma ¹⁴CO₂ está presente em quantidades desprezíveis, não apresentando importância fisiológica. Todavia, com ¹³CO₂ é diferente. As propriedades químicas do ¹³CO₂ são idênticas às do ¹²CO₂, mas devido a leve diferença de massa (2,3%), a maioria das plantas

assimila menos o $^{13}\text{CO}_2$ que o $^{12}\text{CO}_2$. Em outras palavras, as plantas discriminam contra os isótopos mais pesados de carbono, apresentando razões de ^{13}C para ^{12}C menores do que as encontradas no CO_2 atmosférico.

A composição de isótopos de carbono é medida com o uso de um espectrômetro de massa, que fornece a seguinte razão:

$$R = \frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2}$$

A composição de isótopos de plantas, $\delta^{13}\text{C}$, é quantificada considerando uma base por mil (-‰):

$$\delta^{13}\text{C}\text{‰} = \left\{ \left(\frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} \right) - 1 \right\} \times 1000$$

Os valores típicos da razão de isótopos de carbono de plantas variam entre plantas C_3 , C_4 e CAM. As C_3 têm $\delta^{13}\text{C}$ de aproximadamente -28‰, enquanto as C_4 têm um valor médio de -14‰. As plantas C_3 e C_4 têm menos ^{13}C do que o isótopo padrão ($\delta^{13}\text{C} = -8\text{‰}$), significando que houve uma discriminação contra ^{13}C durante o processo fotossintético.

Estas diferenças são explicadas pelos valores intrínsecos de discriminação das enzimas de carboxilação das plantas C_3 e C_4 . A **RUBISCO** tem um valor de discriminação contra ^{13}C de -30%. Por outro lado, a **PEPcarboxilase** (PEPcase), enzima primária de fixação do CO_2 das C_4 , tem um efeito de discriminação muito menor (cerca de -2 a -6%), o que determina as diferenças nas composições de isótopos observadas nessas plantas. Em plantas C_3 a discriminação potencial da RUBISCO não é totalmente expressa porque a disponibilidade de CO_2 no sítio de carboxilação torna-se um fator limitante. Maior discriminação ocorre quando a concentração interna de CO_2 é alta, como se verifica quando os estômatos encontram-se abertos, o que, por outro lado, facilita a perda de água. Assim, uma menor eficiência no uso da água está relacionada com maior discriminação contra ^{13}C .

Em função disso, a discriminação de isótopos pode ser utilizada para identificar se uma planta CAM funciona como CAM ou como C_3 , o que depende, principalmente, das condições de umidade e da temperatura. As plantas CAM podem ter valores intermediários de $\delta^{13}\text{C}$ entre os de plantas C_3 e C_4 . Em plantas CAM que fixam o CO_2 à noite via PEPcase, o $\delta^{13}\text{C}$ é de semelhante ao de

plantas C_4 . Entretanto, quando as plantas CAM encontram-se bem hidratada, elas mudam a fotossíntese para o processo C_3 , abrindo os seus estômatos durante o dia e fixando o CO_2 via RUBISCO. Sob tais condições, a composição de isótopos desloca-se mais na direção da de plantas C_3 . Assim, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de plantas CAM refletem quanto de carbono é fixado por meio da rota C_3 versus a rota C_4 .

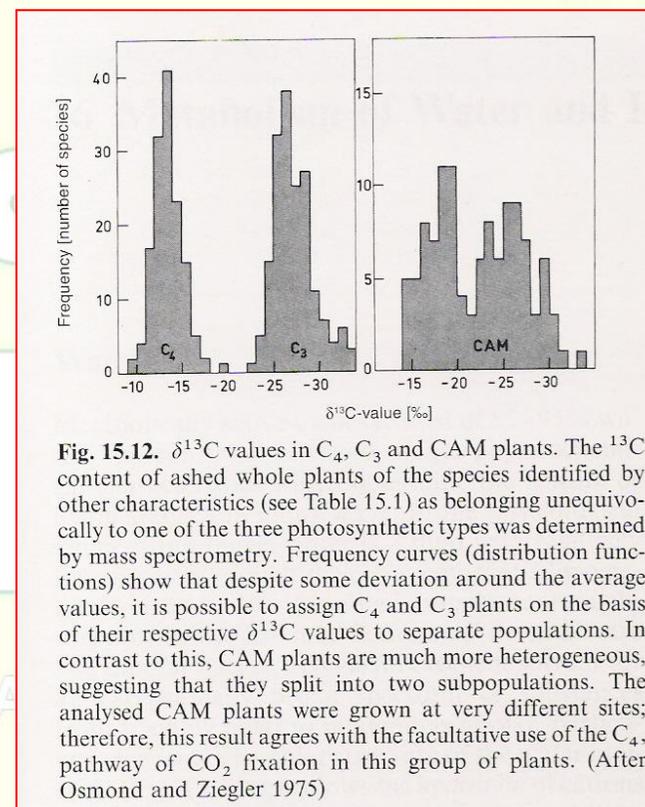


Fig. 15.12. $\delta^{13}\text{C}$ values in C_4 , C_3 and CAM plants. The ^{13}C content of ashed whole plants of the species identified by other characteristics (see Table 15.1) as belonging unequivocally to one of the three photosynthetic types was determined by mass spectrometry. Frequency curves (distribution functions) show that despite some deviation around the average values, it is possible to assign C_4 and C_3 plants on the basis of their respective $\delta^{13}\text{C}$ values to separate populations. In contrast to this, CAM plants are much more heterogeneous, suggesting that they split into two subpopulations. The analysed CAM plants were grown at very different sites; therefore, this result agrees with the facultative use of the C_4 -pathway of CO_2 fixation in this group of plants. (After Osmond and Ziegler 1975)

A discriminação de $\delta^{13}\text{C}$ pode ser, portanto, um indicador bastante preciso de que o Ciclo de Calvin (via RUBISCO) foi precedido por uma fixação acessória de CO_2 através da PEPcase. Em função disso, a discriminação de isótopos também pode ser utilizada para identificar, por

exemplo, se o açúcar de mesa (sacarose) é proveniente da cana-de-açúcar (C_4) ou da beterraba (C_3), se o mel de néctar de plantas C_3 está diluído com sacarose de cana ou, ainda, se o vinho, proveniente de fermentação da uva (C_3), está adulterado pela fermentação utilizando carboidratos de plantas C_4 .



FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



4. SÍNTESE DE AMIDO E DE SACAROSE:

Na maioria das espécies a sacarose é a principal forma de carboidrato translocada no floema. O amido, por sua vez, é uma reserva estável e insolúvel de carboidrato. Tanto amido quanto a sacarose são sintetizados a partir de trioses fosfato geradas pelo Ciclo de Calvin.

Eletromicrografias e estudos de localização enzimática não deixam dúvidas de que o sítio de síntese do amido nas folhas é o cloroplasto. O amido é sintetizado a partir de *triose fosfato* via *frutose-1,6-bifosfato* (Tabela 8.5 e Figura 8.14). A *glicose-1-fosfato* intermediária é convertida em *ADP-glicose* via *ADP-glicose pirofosforilase* (Fig. 8.14 e Tab. 8.5, reação 5) em uma reação que requer ATP e produz *pirofosfato* (PPi, ou $H_2P_2O_7^{2-}$). Assim, como em muitas reações biossintéticas, o PPi é hidrolisado a duas moléculas de *ortofosfato* (Pi) por meio de uma *pirofosfatase* inorgânica específica, acionando, desse modo, a reação 5 na direção da produção de *ADP-glicose*. Por fim, a porção glicose da *ADP-glicose* é transferida para a extremidade não-redutora (carbono 4) da *glicose* terminal de uma cadeia de amido em crescimento (Tab. 8.5, reação 7), completando, assim, a seqüência de reações.

O sítio de síntese da sacarose é o citossol, o que foi comprovado por estudos de fracionamento celular e de análises enzimáticas. A síntese de *sacarose* também ocorre a partir de *triose fosfato*, por uma rota similar à rota de síntese de amido, ou seja, via *frutose-1,6-bifosfato* e *glicose-1-fosfato* (Fig. 8.14 e Tab. 8.6, reações 2-6). Na síntese da sacarose, a *glicose-1-fosfato* é convertida a *UDP-glicose* por intermédio de uma *UDP-glicose fosforilase* específica (Tab. 8.6, reação 7), análoga à *ADP-glicose pirofosforilase* dos cloroplastos. Nesse estágio, duas reações consecutivas completam a síntese da sacarose. Primeiro, a *sacarose-6-fosfato sintase* catalisa a reação da *UDP-glicose* com a *frutose-6-fosfato*, produzindo *sacarose-6-fosfato* e *UDP* (Tab. 8.6, reação 9). Posteriormente, a *sacarose-6-fosfato fosfatase* (*fosfo-hidrolase*) remove o *fosfato* da *sacarose-6-fosfato*, produzindo *sacarose* (Tab. 8.6, reação 10). Esta última reação, que é essencialmente irreversível, move a primeira reação na direção da síntese de sacarose.

A transformação de *triose fosfato* em *glicose-1-fosfato* nas rotas de síntese de amido e de sacarose apresenta várias etapas comuns. Entretanto, tais rotas utilizam *isoenzimas* que são específicas aos cloroplastos ou ao citossol. Por exemplo, a *frutose-1,6-bifosfatase* do cloroplasto é regulada pelo sistema *tiorredoxina*, mas não pela *frutose-1,6-bifosfato* e *AMP*. Por outro lado, a forma citossólica da enzima é regulada pela *frutose-1,6-bifosfato*, sensível ao *AMP*, especialmente na presença de *frutose-1,6-bifosfato*, e não é afetada pelo *tiorredoxina*. Excetuando-se a *frutose-1,6-bifosfatase* do citossol, a síntese de sacarose é regulada ao nível de *sacarose fosfato sintase*, uma enzima alostérica ativada pela *glicose-6-fosfato* e inibida por *ortofosfato*. A enzima é inativada no escuro pela fosforilação de um resíduo específico de *serina* via uma proteína *quinase* e ativada na luz pela *desfosforilação* via uma proteína *fosfatase*. A *glicose-6-fosfato* inibe a *quinase*, enquanto, *Pi* inibe a *fosfatase*. Estudos recentes (2000) mostraram que a *sacarose-6-fosfato sintase* e a *sacarose-6-fosfatase* existem como um complexo supramolecular apresentando atividade enzimática maior do que a atividade de ambas isoladas.

As sínteses de sacarose e de amido são reações competitivas. As concentrações relativas de *ortofosfato* (Pi) e *triose fosfato* são os principais fatores que controlam se o carbono fixado será compartimentado como amido no cloroplasto ou como sacarose no citossol. Os dois compartimentos comunicam-se por meio do *transportador fosfato/triose fosfato*, um transportador do tipo *antiporte* estequiométrico estrito. Uma baixa concentração de *ortofosfato* no citossol limita a exportação de *triose fosfato* do cloroplasto, promovendo assim a síntese de amido. Por outro lado, uma abundância de *Pi* no citossol inibe a síntese de amido no cloroplasto, estimulando a exportação de *triose fosfato* para o citossol, onde esta é convertida em sacarose.

Ortofosfato e a *triose fosfato* controlam a atividade de várias enzimas reguladoras nas rotas biossintéticas da sacarose e do amido. A enzima *ADP-glicose pirofosforilase* (Tab. 8.5, reação 5) do cloroplasto é a enzima-chave que regula a síntese de amido a partir de *glicose-1-fosfato*.

Esta enzima é estimulada por *3-fosfoglicerato* e inibida por *ortofosfato*. Uma alta razão *3-fosfoglicerato/ortofosfato* é tipicamente encontrada em cloroplastos iluminados que estejam sintetizando amido ativamente. Condições recíprocas prevalecem no escuro.

A *frutose-2,6-bifosfato* é uma molécula-chave de controle, a qual proporciona um aumento na síntese de sacarose na luz e uma redução no escuro. Ela é encontrada no citossol em concentração muito baixa e exerce efeito regulatório na interconversão citossólica da *frutose-1,6-bifosfato* e *frutose-6-fosfato*. O aumento na *frutose-2,6-bifosfato* citossólica está associado a taxas reduzidas de síntese de sacarose, pois a *frutose-2,6-bifosfato* é um forte inibidor da *frutose-1,6-bifosfatase* citossólica (Tab. 8.6, reação 4a) e um ativador da *fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato* (reação 4b).

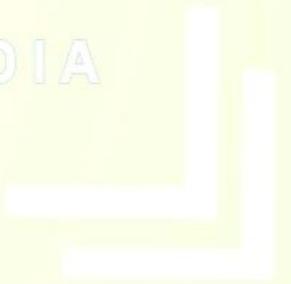
A *frutose-2,6-bifosfato* é sintetizada a partir da *frutose-6-fosfato* por uma *frutose-6-fosfato 2-quinase* especial (diferente da *frutose-6-fosfato-1-quinase* da glicólise) e é degradada especificamente pela *frutose-2,6-bifosfatase* (diferente da *frutose-1,6-bifosfatase* do Ciclo de Calvin). As atividades da *quinase* e da *fosfatase* são controladas pelo *ortofosfato* e pela *triose fosfato*. O *ortofosfato* estimula a *frutose-6-fosfato 2-quinase* e inibe a *frutose-2,6-bifosfatase*. A *triose fosfato* inibe a *2-quinase* (Fig. 8.16). Conseqüentemente, uma baixa razão citossólica entre *triose fosfato* e *ortofosfato* (*Pi*) promove a formação de *frutose-2,6-bifosfato*, que, por sua vez, inibe a hidrólise da *frutose-1,6-bifosfato* citossólica e reduz a taxa de síntese de sacarose. Uma razão alta tem efeito oposto. Assim, a síntese de amido a partir de triose fosfato durante o dia pode ser separada de sua quebra durante a noite, a qual é necessária para fornecer energia para as plantas.

A luz regula a concentração desses ativadores e inibidores por intermédio das reações associadas com a fotossíntese e, assim, controla a concentração de *frutose-2,6-bifosfato* no citossol. A enzima glicolítica *fosfofrutoquinase* também funciona na conversão da *frutose-6-fosfato* a *frutose-1,6-bifosfato*, mas nas plantas ela não é afetada apreciavelmente pela *frutose-2,6-bifosfato*. A atividade da *fosfofrutoquinase* nas plantas parece ser regulada pelas concentrações relativas de ATP, ADP e AMP.



LOGIA
ETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



5. METABOLISMO DE LIPÍDIOS:

Enquanto os animais utilizam as gorduras para armazenamento de energia, as plantas as utilizam principalmente para armazenar carbono. Gorduras e óleos são formas importantes de armazenagem de carbono reduzido em muitas sementes oleaginosas, como a soja, o girassol, o amendoim e o algodão. Os óleos têm em uma grande função de armazenagem em plantas não domesticadas que produzem sementes pequenas. Alguns frutos, como o abacate e as azeitonas, também armazenam gorduras e óleos.

Gorduras e óleos pertencem à classe geral de lipídios, um grupo estruturalmente diverso de compostos hidrofóbicos, solúveis em solventes orgânicos e altamente insolúveis em água. Os lipídios representam uma forma de carbono mais reduzida que os carboidratos, de modo que a oxidação completa de 1 g de gordura ou óleo, que contém cerca de 40 kJ ou 9,3 kcal de energia, pode produzir consideravelmente mais ATP que a oxidação de 1 g de amido (15,9 kJ ou 3,8 kcal). Entretanto, a biossíntese de gorduras, óleos e lipídios de membranas também requer um investimento correspondentemente grande de energia metabólica.

Substrato	Reação	QR
Carboidratos (glicose)	$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \longrightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O + 36 ATP$	1,0
Lipídios (ácido oléico)	$C_{18}H_{34}O_2 + 25,5 O_2 \longrightarrow 18 CO_2 + 17 H_2O$	≈ 0,7
Ácidos orgânicos e fermentação		> 1,0

Outros lipídios são importantes para a estrutura e o funcionamento das plantas, embora não sejam utilizados para a armazenagem de energia. Esses lipídios incluem as ceras, a cutina e a suberina, que são constituintes da cutícula protetora e de outras estruturas que reduzem a perda de água de tecidos expostos, e os terpenóides (isoprenóides), que incluem os carotenóides, relacionados à fotossíntese, e os esteróides, presentes em muitas membranas.

Gorduras e óleos existem principalmente na forma de *triacilgliceróis* (*acil* refere-se à porção de ácido graxo) ou *triglicerídeos*, nos quais as moléculas de ácidos graxos são unidas por ligações ésteres aos três grupos hidroxilas do *glicerol*.

Os ácidos graxos em plantas são normalmente ácidos carboxílicos de cadeia reta com um número par de átomos de carbono. As cadeias podem ser curtas (12 unidades) ou longas (20 ou mais unidades). Os óleos são líquidos à temperatura ambiente, principalmente devido à presença de ligações insaturadas nos seus ácidos graxos. As gorduras, que apresentam uma maior proporção de ácidos graxos saturados, são sólidas à temperatura ambiente.

A composição dos ácidos graxos nos lipídios varia com a espécie. Por exemplo, o óleo de amendoim apresenta 9% de ácido palmítico (16:0), 59% de ácido oléico (18:1) e 21% de ácido linoléico (18:2), enquanto o óleo de sementes de algodão é constituído de 20% de ácido palmítico, 30% de ácido oléico e 45% de ácido linoléico. Na maioria das sementes, os *triacilgliceróis* são armazenados nos *oleossomos* (*esferossomos*). Os *oleossomos* apresentam uma barreira de membrana pouco usual, que separa os triglicerídios do citoplasma aquoso. Uma camada única de fosfolipídios, isto é, ½ unidade de membrana, circunda o corpo lipídico, com as porções hidrofílicas dos *fosfolipídios* expostas ao citossol e as cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos *acil* para o interior dos *triacilgliceróis*. Os *oleossomos* são estabilizados pela presença de proteínas específicas, denominadas *oleosinas*, que cobrem a superfície e impedem que os fosfolipídios de corpos lipídicos adjacentes entrem em contato e se fusionem.

Esta estrutura de membrana singular dos *oleossomos* resulta do padrão de biossíntese dos *triacilgliceróis*, cuja síntese é completada por enzimas localizadas nas membranas do *retículo endoplasmático*, acumulando-se as gorduras resultantes entre duas monocamadas da bicamada lipídica da membrana do retículo. A bicamada intumescce e se separa à medida que mais gorduras são adicionadas à estrutura em

crescimento e, por fim, um corpo lipídico maduro se solta do retículo endoplasmático.

As membranas celulares são constituídas de bicamadas de moléculas *anfipáticas*, contendo *porções polares* e *apolares*. As porções polares (cabeça) ficam em contato com o ambiente aquoso, enquanto as porções apolares (hidrofóbicas) impedem a difusão aleatória de solutos entre os compartimentos. Os *glicerolipídios* polares são os principais lipídios estruturais nas membranas. Nesses lipídios, a porção hidrofóbica consiste de duas cadeias de ácidos graxos de 16 a 18 carbonos esterificados nas posições 1 e 2 a uma estrutura de glicerol. Existem duas categorias de *glicerolipídios polares*: os *gliceroglicolipídios* (açúcares formam o grupamento terminal) e os *glicerofosfolipídios* (o grupo terminal contém fósforo).

As membranas vegetais possuem lipídios estruturais adicionais, incluindo *esfingolipídios* e *esteróis*, os quais, todavia, são constituintes minoritários. Outros lipídios desempenham papéis específicos na fotossíntese e em outros processos, dentre os quais estão as clorofilas, as plastoquinonas, os carotenóides e os tocoferóis, que juntos contabilizam 1/3 dos lipídios das folhas.

As membranas dos cloroplastos, que contabilizam 70% dos lipídios de membrana em tecidos fotossintéticos, são dominadas por *gliceroglicolipídios*. Outras membranas das células contêm *glicerofosfolipídios*. Em tecidos não fotossintetizantes os *fosfolipídios* são os principais *glicerolipídios* das membranas.

Biossíntese de Ácidos Graxos:

A biossíntese de ácidos graxos envolve a condensação cíclica de uma unidade de dois carbonos nas quais o *acetil-CoA* é o precursor. Em plantas os ácidos graxos são sintetizados exclusivamente em *plastídios*. Em animais esse processo é citossólico. Acredita-se que as enzimas da rota sejam mantidas juntas em um complexo coletivo denominado *ácido graxo sintase*. O complexo permite que a série de reações ocorra mais eficientemente do que se as enzimas fossem separadas. Além disso, as cadeias *acil* em crescimento são

ligadas covalentemente a uma proteína ácida de baixo peso molecular, denominada *proteína carregadora de acil* – ACP (*acyl carrier protein*). Quando conjugada à proteína carregadora *acil*, a cadeia de ácidos graxos é chamada *acil-ACP*.

A primeira etapa da síntese de ácidos graxos é a síntese de *malonil-CoA* a partir do *acetil-CoA* e CO_2 , pela enzima *acetil-CoA carboxilase* (Fig 11.16). A forte regulação dessa enzima parece controlar a taxa global de síntese de ácidos graxos. O *malonil-CoA*, então, reage com o ACP, gerando *malonil-ACP*:

1. No primeiro ciclo da síntese de ácidos graxos, o grupo acetato do *acetil-CoA* é transferido a uma *cisteína* específica da enzima *condensadora* (*3-cetoacil-ACP sintase*) e, então, combinado com o *malonil-ACP* para formar *acetoacetil-ACP*.

2. Em seguida, o grupo *ceto* do carbono 3 é removido (reduzido) pela ação de três enzimas para formar uma nova cadeia *acil* (*butiril-ACP*), que tem agora quatro carbonos de comprimento.

3. O ácido de quatro carbonos e uma outra molécula de *malonil-ACP* tornam-se, então, os novos substratos para a *enzima condensadora*, resultando na adição de outra unidade de dois carbonos à cadeia em crescimento e o ciclo continua até que 16 ou 18 carbonos tenham sido adicionados.

4. Alguns *16:0-ACP* são liberados da maquinaria da *ácido graxo sintase* (Fig. 11.17), mas a maioria das moléculas que são alongadas para *18:0-ACP* é eficientemente convertida a *18:1-ACP* por uma enzima *dessaturase*. A repetição de eventos faz do *16:0-ACP* e do *18:0-ACP* os principais produtos da síntese de ácidos graxos em plastídios.

Os ácidos graxos podem ser submetidos a modificações subseqüentes após serem ligados ao glicerol para formar os *glicerolipídios*. Ligações duplas adicionais são inseridas nos ácidos graxos 16:0 e 18:1 por uma série de isoenzimas *dessaturases*, que são proteínas integrais de membranas encontradas nos cloroplastos e no retículo endoplasmático. Cada *dessaturase* insere uma ligação dupla em uma posição específica da

cadeia de ácidos graxos. As enzimas agem sequencialmente para formar o 18:3 e o 16:3.

Os ácidos graxos sintetizados nos plastídios são, em seguida, utilizados para compor os *glicerolipídios* das membranas dos *oleossomos*. As primeiras etapas de síntese dos *glicerolipídios* são duas reações de *acilação* que transferem ácidos graxos da *acil-ACP* ou *acil-CoA* para o *glicerol-3-fosfato* para formar *ácido fosfatídico*.

A ação de uma *fosfatase* específica produz *diacilglicerol (DAG)* a partir de *ácido fosfatídico*. O *ácido fosfatídico* também pode ser convertido diretamente em *fosfatidilinositol* ou em *fosfatidilglicerol*. *DAG* pode originar *fosfatidiletanolamina* ou *fosfatidilcolina*. A localização das enzimas de síntese dos *glicerolipídios* revela uma interação complexa e altamente regulada entre os cloroplastos, onde os ácidos graxos são sintetizados, e outros sistemas de membranas. Em termos simples, a bioquímica envolve duas rotas conhecidas (Fig 11.17) como *rota procariótica* (de cloroplastos) e como *rota eucariótica* (de retículo endoplasmático):

1. Em cloroplastos, a *rota procariótica* utiliza os produtos 16:0 e 18:1-*ACP* da síntese de ácidos graxos nos cloroplastos para sintetizar o *ácido fosfatídico* e seus derivados. Alternativamente, os ácidos graxos podem ser exportados ao citoplasma como *CoA ésteres*.

2. No citoplasma, a *rota eucariótica* utiliza um conjunto separado de *aciltransferases* no retículo endoplasmático para incorporar os ácidos graxos em *ácido fosfatídico* e seus derivados.

Em plantas superiores (*Arabidopsis* e espinafre) as duas rotas contribuem quase que igualmente para a síntese de lipídios nos cloroplastos. Em outras espécies, o *fosfatidilglicerol* é o único produto da *rota procariótica*, enquanto os demais lipídios do cloroplasto são sintetizados inteiramente pela *rota eucariótica*. A bioquímica da síntese de *triacilgliceróis* em sementes de oleaginosas é, geralmente, a mesma descrita para *glicerolipídios*. 16:0 e 18:1-*ACP* são sintetizados nos plastídios das células e exportados como *CoA tioésteres*, para a incorporação no *DAG* no retículo endoplasmático. As enzimas-chave no

metabolismo de sementes oleaginosas (não mostradas na figura 11.17) são a *acil-CoA:DAG aciltransferase* e a *PC:DAG aciltransferase*.

A composição lipídica influencia a função das membranas. A tolerância ao frio tem sido associada à capacidade de manutenção da fluidez das membranas. O primeiro fato observado durante a redução da temperatura em níveis próximos à zero é o decréscimo na fluidez das membranas nas espécies sensíveis ao frio. O evento primário do dano por resfriamento é uma transição de uma fase líquido-cristalina para uma fase gel nas membranas celulares. O grau de insaturação dos ácidos graxos determina a temperatura na qual o dano ocorre. A tolerância a diferentes tipos de estresses ambientais, além do estresse por frio, tem sido associada a alterações na composição lipídica ou no grau de insaturação da membrana, o que ocorre em resposta a diferentes tipos de estresses como por seca, alumínio e por solos salinos, dentre outros.

Os lipídios das membranas podem ser alvos da ação de radicais livres (espécies reativas de oxigênio-ROIs), levando ao fenômeno da peroxidação dos lipídios. A peroxidação dos lipídios tem início com a retirada de um átomo de hidrogênio das moléculas de ácidos graxos insaturados. O subsequente rearranjo das ligações duplas resulta na formação de dieno conjugado que, após o ataque por oxigênio molecular, produz radicais peroxi-lipídicos e endoperóxidos. A formação de endoperóxidos em ácidos graxos insaturados apresentando, pelo menos, três metilenos interrompidos por ligações duplas pode resultar na formação de aldeído malônico (MDA), um produto da degradação dos lipídios. A ação de enzimas e do metabolismo antioxidativo não-enzimático evitam e/ou minimizam os danos às membranas causados pelos ROIs.

Os lipídios de membranas são importantes precursores de compostos sinalizadores. O *jasmonato*, um derivado do *ácido linoléico*, por exemplo, ativa as defesas vegetais contra insetos e contra muitos fungos fitopatogênicos, estando envolvido também em outros eventos do crescimento vegetal. O *fosfatidilinositol-4-5-bifosfato (PIP₂)* é o mais importante dos vários derivados fosfatados do *fosfatidilinositol* conhecidos

como *fosfoinosítideos*. Em animais e, acredita-se, que também em plantas, a ativação mediada por receptores da *fosfolipase C* leva à hidrólise do PIP_2 a *inositol trifosfato* (IP_3) e *diacilglicerol*, sendo que ambos agem como mensageiros secundários intracelulares. A ação do IP_3 em liberar Ca^{2+} no citoplasma tem sido associada à regulação de diferentes processos celulares, incluindo ao fechamento estomático pela ação do ácido abscísico (ABA).



FISILOGIA VEGETAL

UMA ABORDAGEM PRÁTICA EM MULTIMÍDIA



6. CONEXÃO DO METABOLISMO PRIMÁRIO AO METABOLISMO SECUNDÁRIO:

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta sobre o seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias são conhecidas como *metabólitos secundários* (ou produtos naturais). Essas substâncias não apresentam efeitos diretos sobre processos celulares primários como a fotossíntese, respiração, translocação de solutos e água, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes, dentre outros. Os metabólitos secundários também diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios) por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, sendo característicos de uma espécie ou de um grupo de espécies relacionadas, enquanto os metabólitos primários são de ocorrência universal.

Os metabólitos secundários defendem os vegetais contra herbívoros e patógenos, sendo divididos em três grupos principais. Os terpenos, os compostos fenólicos e os alcalóides. Os *terpenos* (ou terpenóides) constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizadas a partir do acetil-CoA ou de intermediários glicolíticos, em duas rotas metabólicas: a rota do *ácido mevalônico* e a *rota do metileritritol fosfato* (MEP). Como exemplos de terpenóides podemos citar as giberelinas, os carotenóides, os piretróides, os óleos essenciais e as saponinas.

Os *compostos fenólicos* são moléculas que contêm um grupo fenol (grupo hidroxila funcional em um anel aromático) em sua molécula. Constituem em vegetais um grupo muito heterogêneo com mais de 10.000 compostos. Alguns são solúveis somente em solventes orgânicos enquanto outros são solúveis em água, havendo alguns altamente insolúveis. Suas funções metabólicas são variadas. Duas rotas metabólicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a *rota do ácido chiquímico* e a *rota do ácido malônico*. Como exemplos de compostos fenólicos podemos destacar a lignina, as cumarinas, os flavonóides (antocianinas), a vanilina, o ácido salicílico e os taninos, dentre outros.

Os *compostos nitrogenados* são constituídos por uma grande variedade de compostos secundários contendo nitrogênio na sua estrutura. Eles incluem algumas moléculas bem conhecidas relacionadas à defesa vegetal contra herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Algumas dessas moléculas são tóxicas aos humanos embora outras possam ser utilizadas no tratamento de doenças devido às suas propriedades medicinais. Os metabólitos secundários nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos comuns do metabolismo protéico.