

IOB 0127 Fitoplâncton e Produção Primária

Histórico das descobertas sobre a Fotossíntese

Profa.Sônia Maria F. Giancesella

Fotossíntese

Importância energética da fotossíntese:

- E solar armazenada : 10^{17} kcal/ano.
- $\rightarrow 10 \times$ mais que E combustível fóssil/ano.
- Dependência global da energia solar,
passada e presente

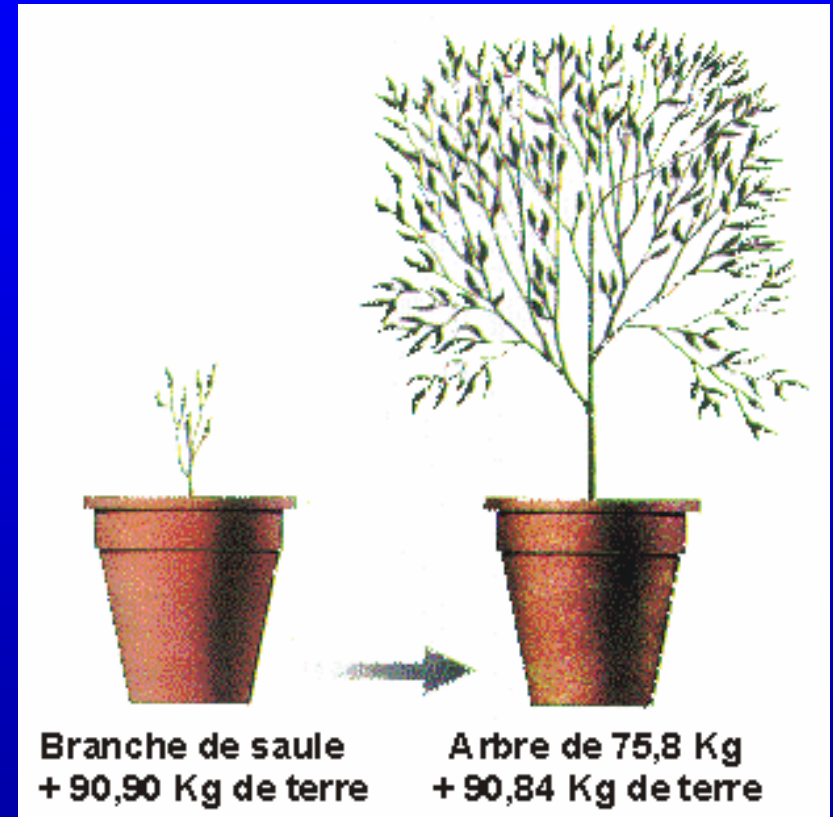
$\rightarrow$ entendimento da fotossíntese propõe os problemas bioquímicos mais fundamentais.

Como se chegou à equação da fotossíntese?

Primeiros experimentos:

Van Helmont (1649):
pesou salgueiro + vaso de
solo. Após 5 anos,
salgueiro > 75,8kg e solo
perdeu 60 gramas.

→ toda a massa do
salgueiro foi produzida
pela água e nada pelo solo.



Joseph Priestley em 1771: exp. c/ broto de menta → plantas reconstituem a atmosfera necessária à vida. Não percebeu que a luz era também necessária.



Ian Ingenhousz (médico holandês: 1796 → apenas a parte verde das plantas reconstitui a atmosfera, e **na presença de luz**.

Primeiro a sugerir que o CO_2 é quebrado na fotossíntese em C e O_2 , com liberação de O_2 .



Portanto, idéia da luz necessária para a fotossíntese
→ cerca de 200 anos.

idéia inicial: O_2 produzido era liberado pelo CO_2 .

1845→Julius R. von Mayer, médico alemão: vegetais convertem E luminosa em E química.

1º. a propor a lei da conservação da E e também o 1º. a descrever reações de oxidação como fonte primária de E para todas as criaturas vivas.

Seu artigo não teve repercussão e James Joule posteriormente levou os créditos da descoberta. Na ocasião, von Mayer tentou suicídio. Propôs idéias que facilitaram desenvolvimento da T relatividade.

<http://www.usd.edu/phys/courses/phys300/gallery/clark/vonmayer.html>



- Richard M. **Willstatter**, químico → 1915 Nobel por seu trabalho com clorofila e outros pigmentos vegetais



<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1915/press.html>

Cornelis Van Niel (1935) microbiol.
holandês → bactérias sulfurosas
púrpura: usam H_2S ao invés de H_2O
para a sua fotossíntese.
Produto final : S_2 e não O_2
→ sugere equação geral que descreve a
fotossíntese tanto das plantas como das bactérias.



Equação geral da fotossíntese:



Na fotossíntese oxigênica, $A = O_{\text{oxigênio}}$.

1°. a propor que a fonte de O_2 na fotossíntese é a água.

Propôs que E luminosa ativa o doador de H e não o CO_2

Bactérias fotossintéticas (anoxigênicas) → doador de e^- é diferente para cada grupo:

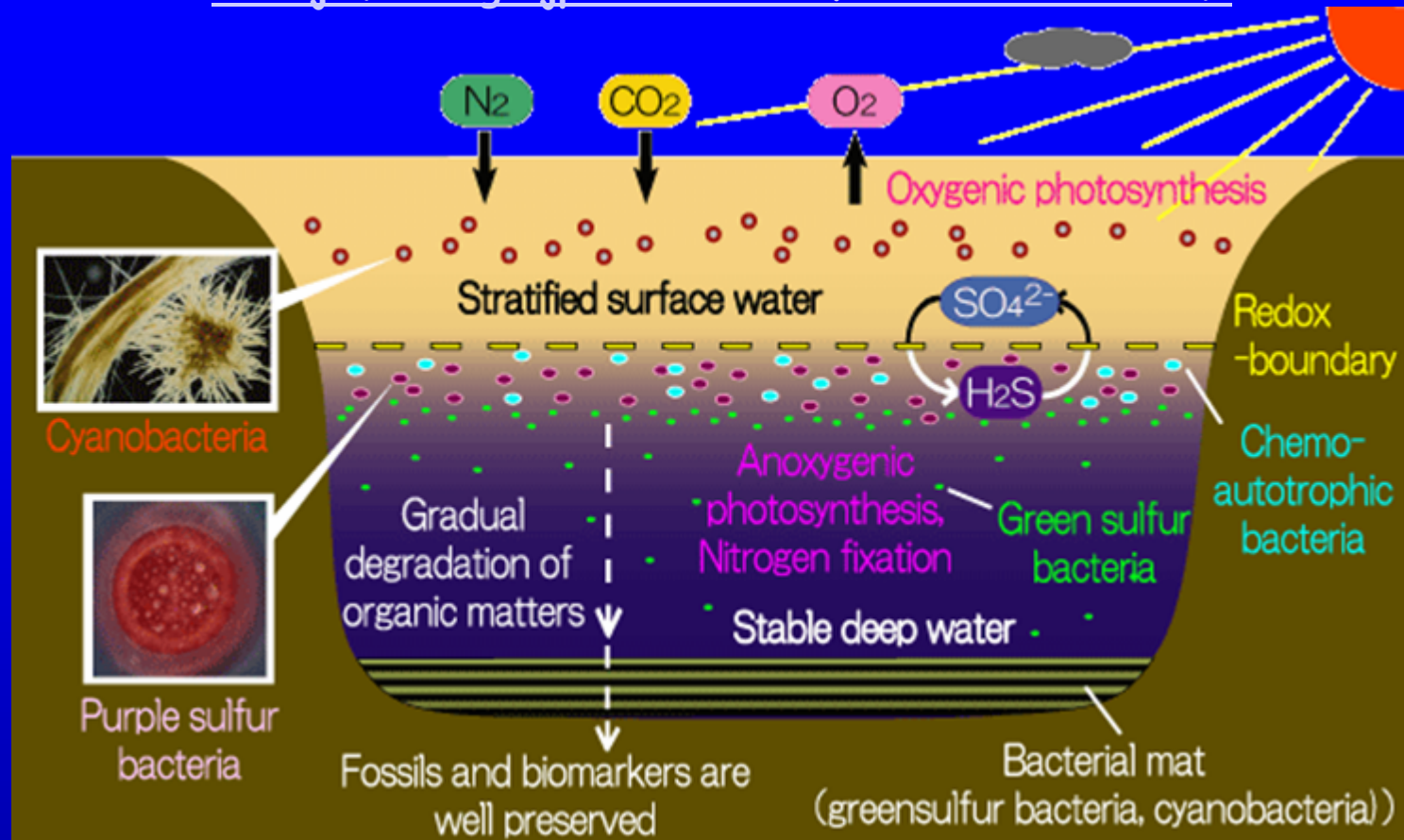
Nas *Athiorhodaceae* (púrpuras não sulfurosas), H_2A é um composto orgânico.



Nas *Thiorhodaceae* (púrpura sulfurosas), é um composto inorgânico de S



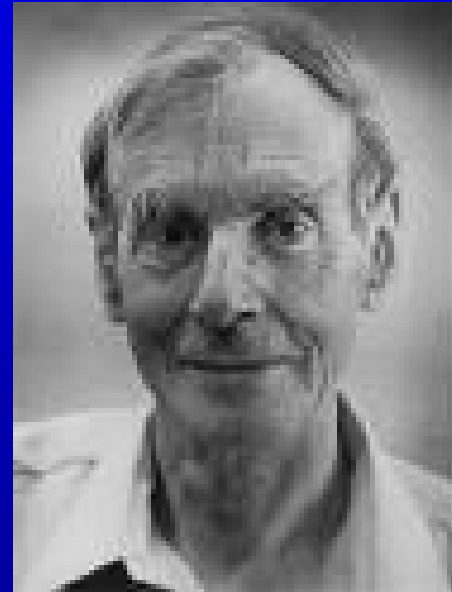
Nas *Chlorobiaceae* (sulfurosas verdes), composto inorgânico de S ou doadores orgânicos.



Fronteira redox: bactérias sulfurosas verdes e púrpura

Confirmação da origem do O_2 pela H_2O :

Robert Hill (1939): substituiu CO_2 por 2,6-diclorofenolindofenol $\rightarrow$ produção de O_2 .



www.bio.cam.ac.uk/~ean25/howelab/images/hill.jpg

Reação de Hill



onde A é o 2,6-diclorofenolindofenol (corante)

O corante passava da forma azul (oxidada) para incolor (reduzida) com os cloroplastos sob a luz.

primeira pista de como a E luminosa é convertida em E química → produz fluxo de elétrons da água para uma molécula aceptora de hidrogênio.

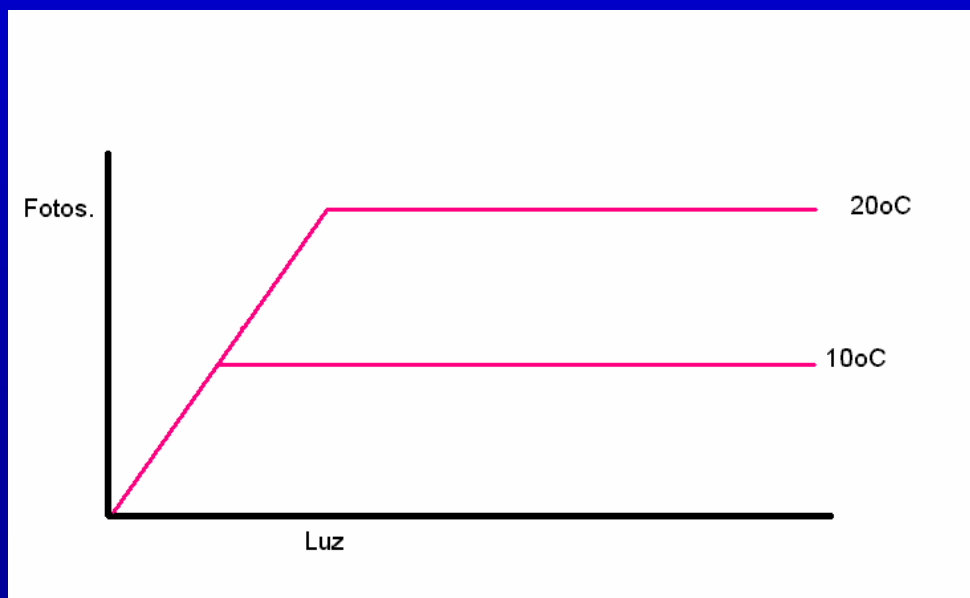
Conclusão → quebra da água pode ser dissociada da redução do CO_2 .

Comprovado também por experimentos com H_2^{18}O (Ruben et al. 1941).

Detalhamento do processo fotossintético:

Primeiras evidências de que a fotossíntese se desenvolve em duas fases, uma luminosa e outra escura: Blackman (1905):

efeito combinado e individual das variações de luz e temperatura.





Em 54, Daniel Arnon et al. :
E da luz é utilizada para sintetizar
ATP.

www.nap.edu

Photograph by Reinhard Bachofen, University
of California at Berkeley, Summer 1988

A.Frenkel, 1954, → ATP é fonte de E para
muitas reações bioquímicas intracelulares

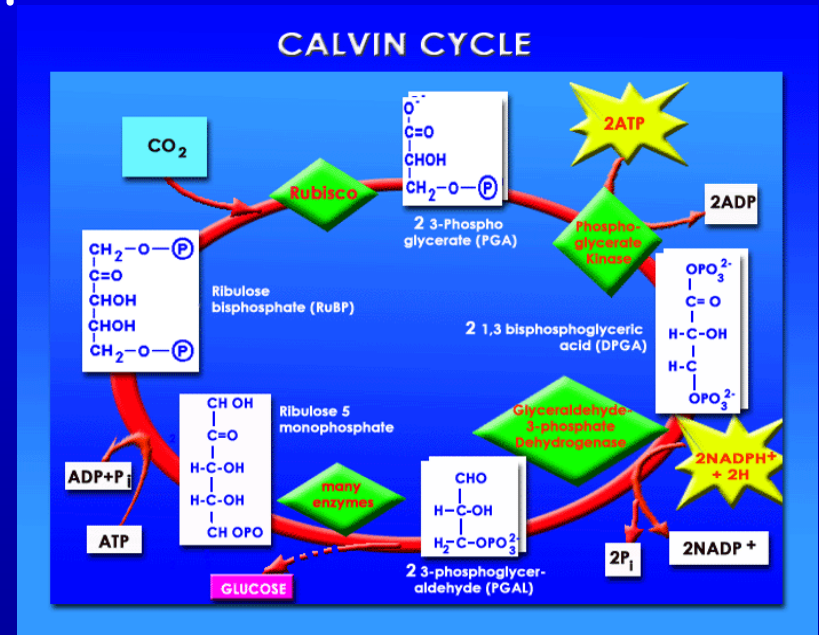
A redução do C pode ocorrer no escuro.

Reações elucidadas final dos anos 40 → Melvin Calvin, Andrew Benson e James Bassham (ciclo de Calvin-Benson) com uso de ^{14}C .

Identificaram a maioria dos passos intermediários.



Calvin : Nobel de Química em 1961 por este trabalho.



www.geosciences.unl.edu

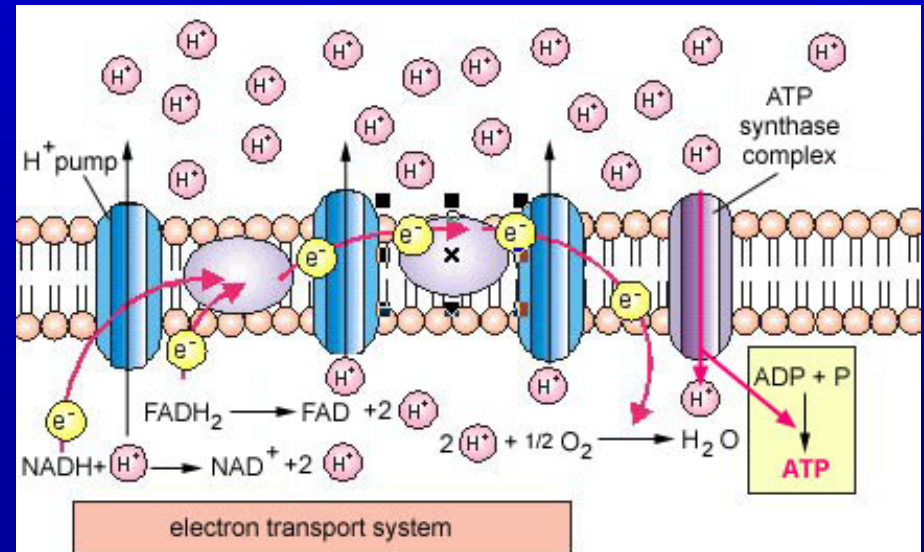
Peter Mitchel (1961):
teoria da transdução
de E quimiosmótica

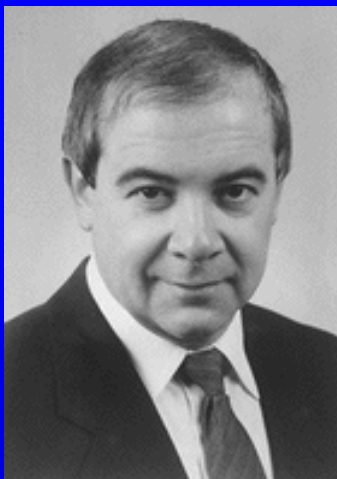


Nobel de
Química em
1978

→ estoque de E por gradiente de prótons através
de membrana.

sps.k12.ar.us/massengale/chemi/osmotic_theory.htm





Em 1980, J. Deisenhofer, H. Mitchel , R. Huber e col.
→ estrutura dos centros de reação .
(Nobel de Química em 1988).

2-Funcionamento do aparelho fotossintético

A unidade fotossintética

Princípios da transformação fotossintética de energia: a natureza da luz

Fase luminosa:

Absorção da luz

Transdução ou Conversão da Energia Luminosa

Transferência de Energia entre Pigmentos

Transporte de elétrons (fluxo ascendente e descendente)

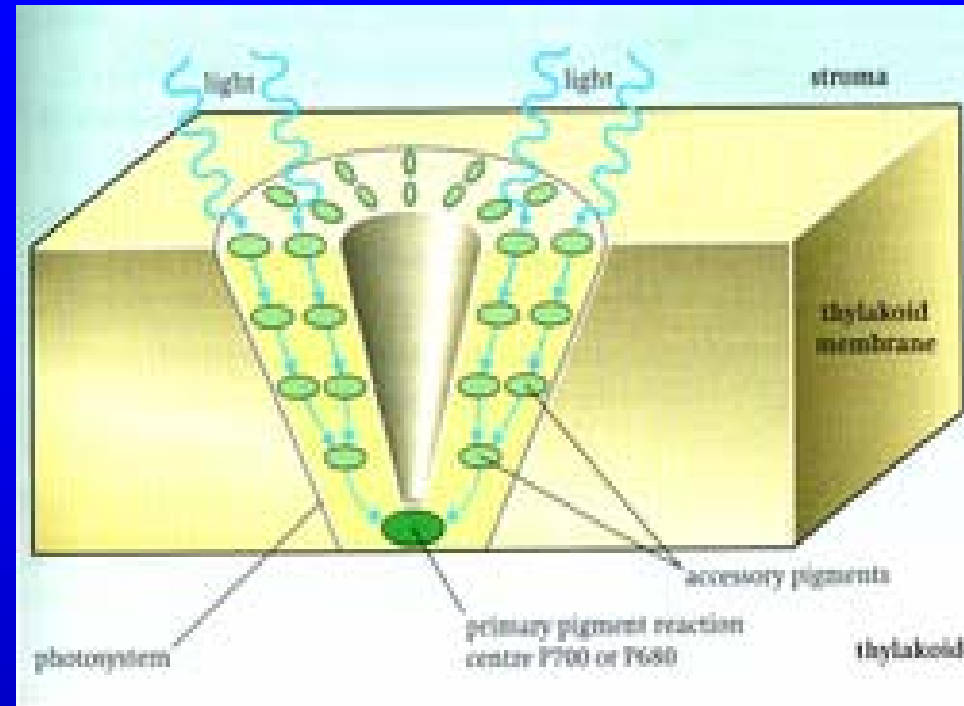
Sistema não cíclico

Sistema cíclico.

Fase escura (enzimática) O caminho do Carbono

2- Funcionamento do aparelho fotossintético

A unidade fotossintética:

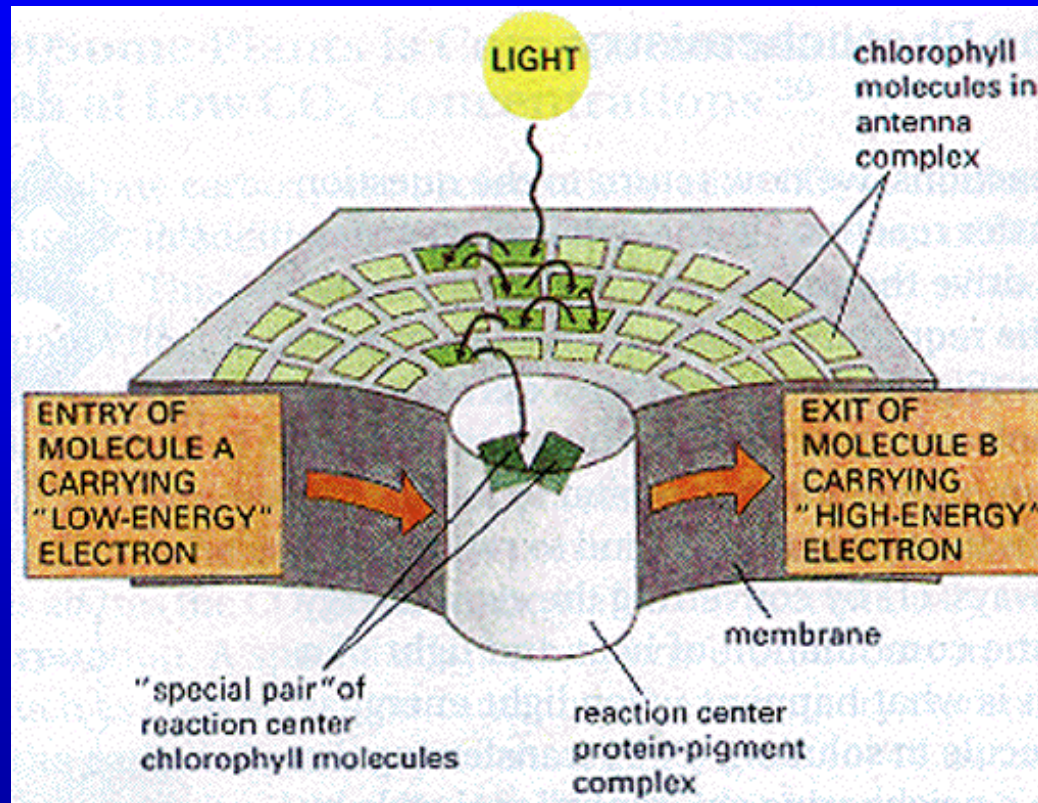


Unidades fotossintéticas ou fotossistemas nos tilacóides

complexo antena $\rightarrow \approx 200$ moléculas de clorofila a / b, ou a / c e ≈ 50 de carotenóides

e centro de reação $\rightarrow$ par de cl-a especial.

Apenas um par de moléculas de Cl-a especiais converte E luminosa em E química.



A conformação espacial do complexo possibilita à luz ser convertida em energia química.

Dois tipos de fotossistemas: fotossistema I e o II, interligados por uma cadeia de transporte de elétrons.

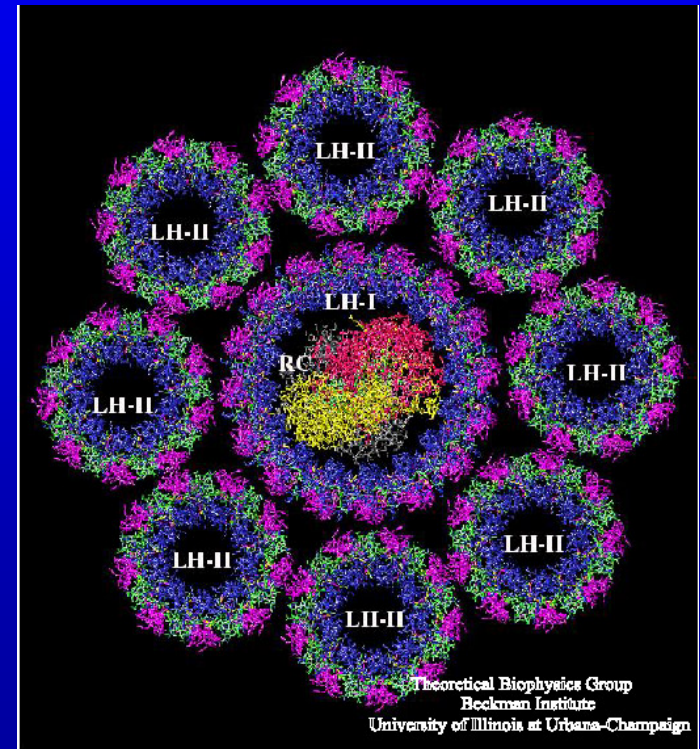
Fotossistemas numerados em ordem de sua descoberta.

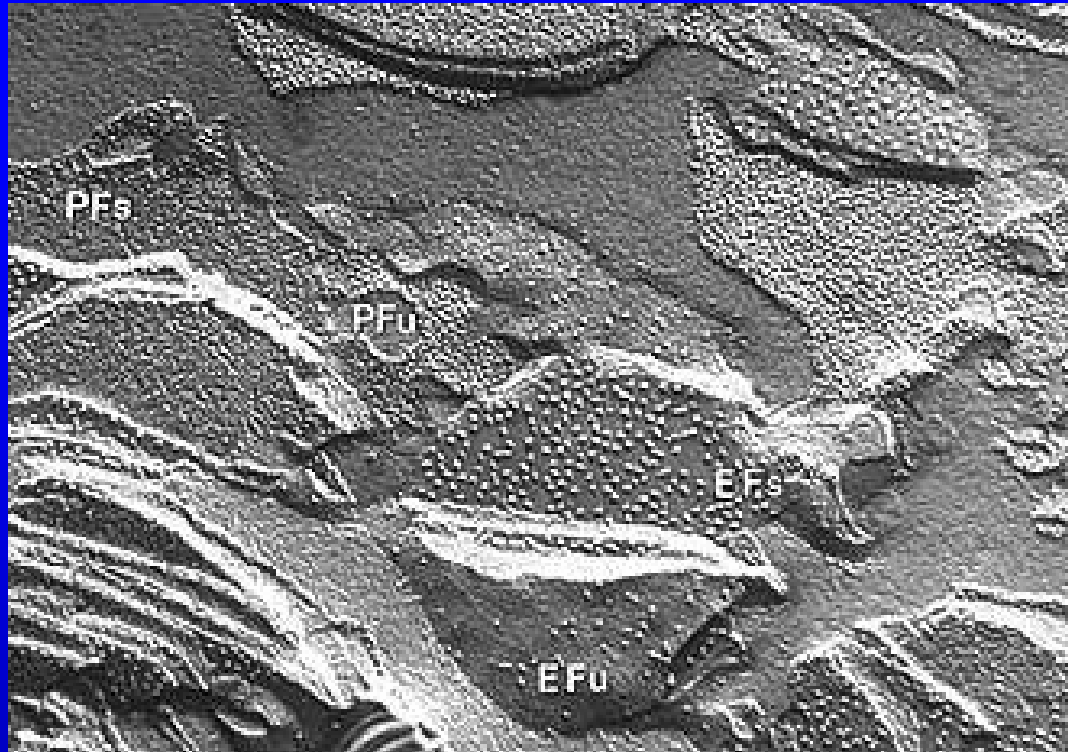
Fotossistema I → excitação máxima sob luz em λ maiores (P700)

→ alta razão clorofila-a / clorofila-b (ou a/c);

Fotossistema II →
excitação máxima sob λ
680nm (P680)

→ baixa razão clorofila a/b
ou a/c.

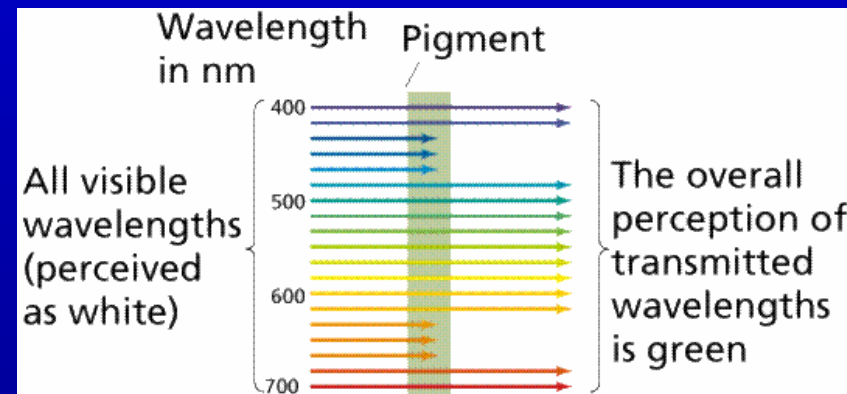
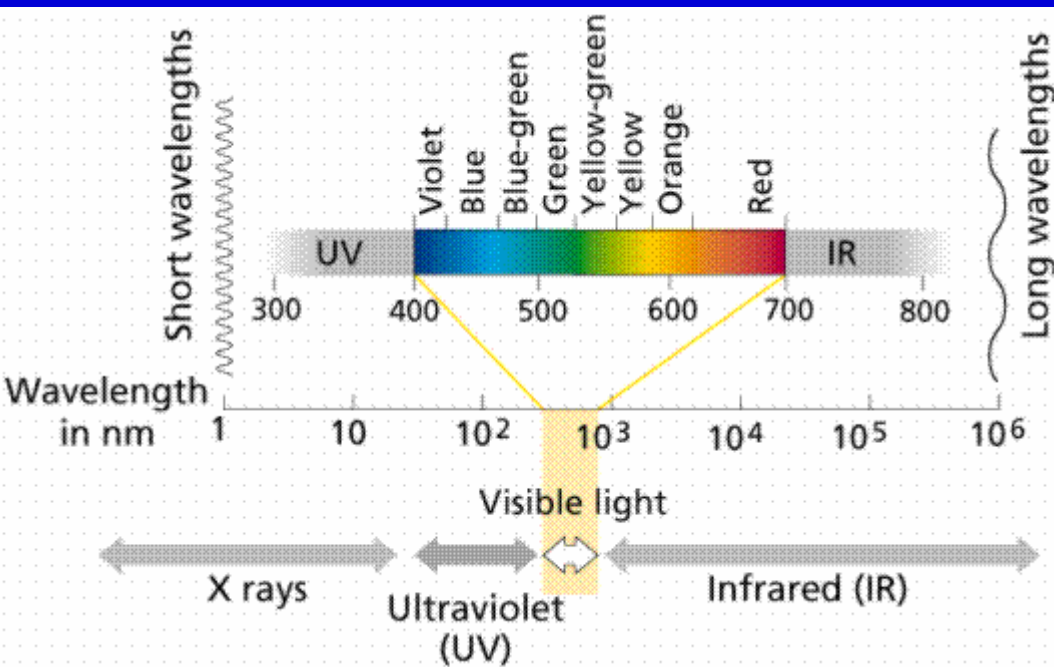




Membranas dos tilacoides → centenas destes fotossistemas.
Cada fotossistema tem função distinta.

Princípios da transformação fotossintética de energia: a natureza da luz

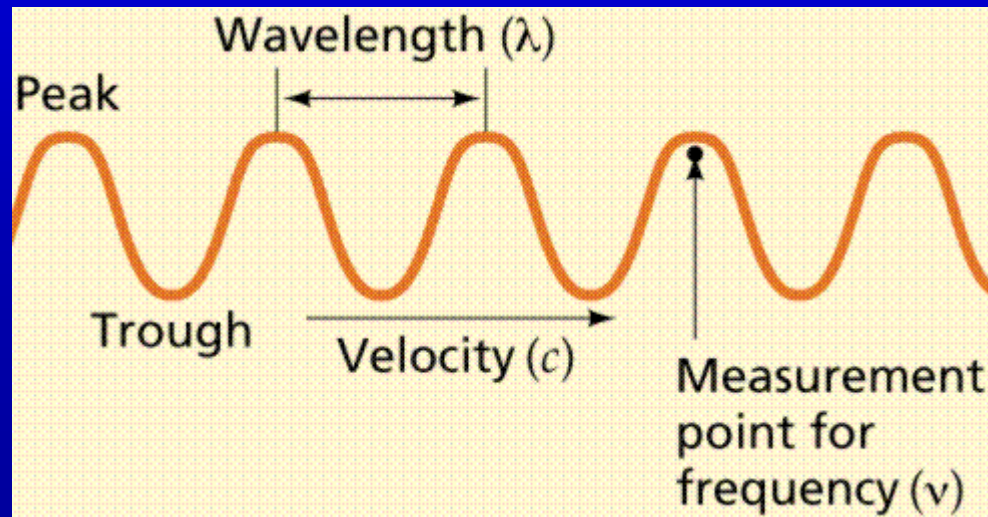
Maxwell (1831-1879) → luz é apenas uma pequena parte de um vasto e contínuo espectro de radiações, o espectro eletromagnético.



Propôs que toda a radiação do espectro tem propriedades **ondulatórias**. Os λ variam de 10^{-5} nm (raios gama) a km (ondas de rádio).

Em 1905, Einstein propôs o modelo da luz como partícula: **fótons** ou quanta de luz.

Os dois modelos são complementares e não auto-excludentes.



Origem da luz solar → fusão nuclear de átomos de H para formar os átomos de He e elétrons. Reação geral é:



onde $h\nu$ = um *quantum* de energia luminosa (fóton).

A E transportada pelo fóton é inversamente proporcional ao λ : os λ mais curtos são mais energéticos.

Portanto → extremidade violeta do espectro carrega maior quantidade de E.

Fase luminosa da fotossíntese: ocorre nas membranas do tilacóide

→ Nessa fase: clorofila e outros pigmentos absorvem a E da luz e esta é estocada como E química no ATP e NADPH. Simultaneamente, o oxigênio é liberado.

→ reações de transferência de prótons e elétrons.

F. escura:

ATP e NADPH gerados na f. luminosa são usados para reduzir o CO_2 sintetizando glicose e outros produtos orgânicos.

Este processo não depende da presença de luz.

Ocorre no estroma do cloroplasto.

Fase luminosa:

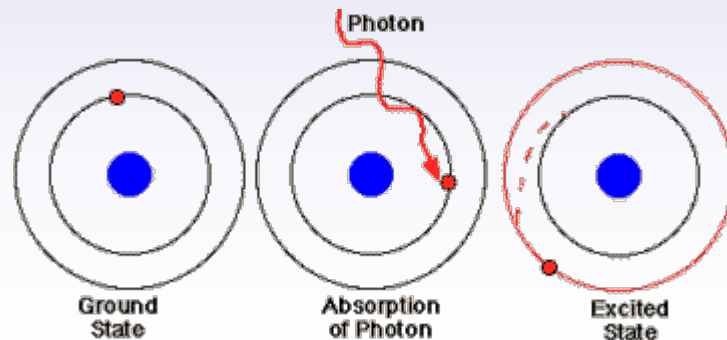
Que ocorre quando um fóton é absorvido pela molécula de pigmento?

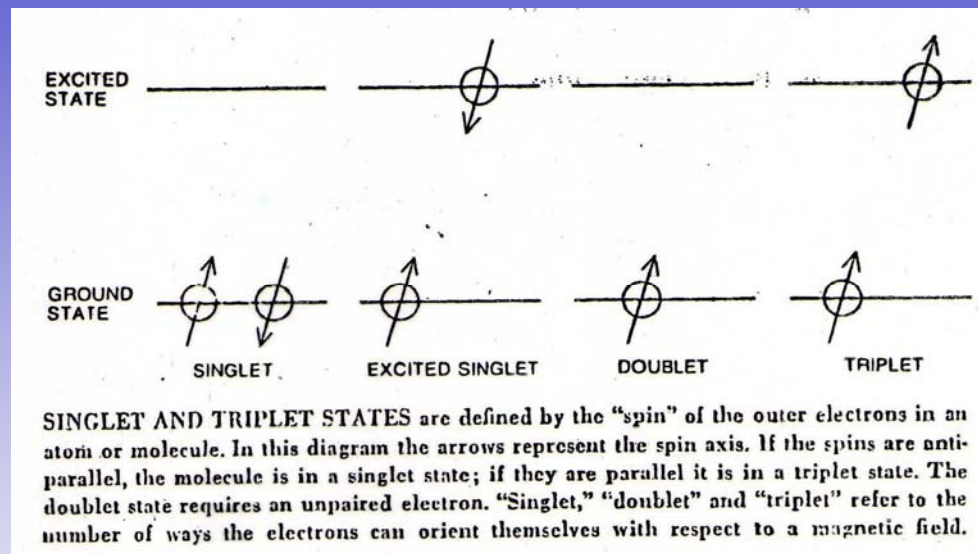
E do fóton é absorvida e fóton desaparece

e- do pigmento sai do estado fundamental (mais estável e de menor E) → estado excitado (rico em energia).

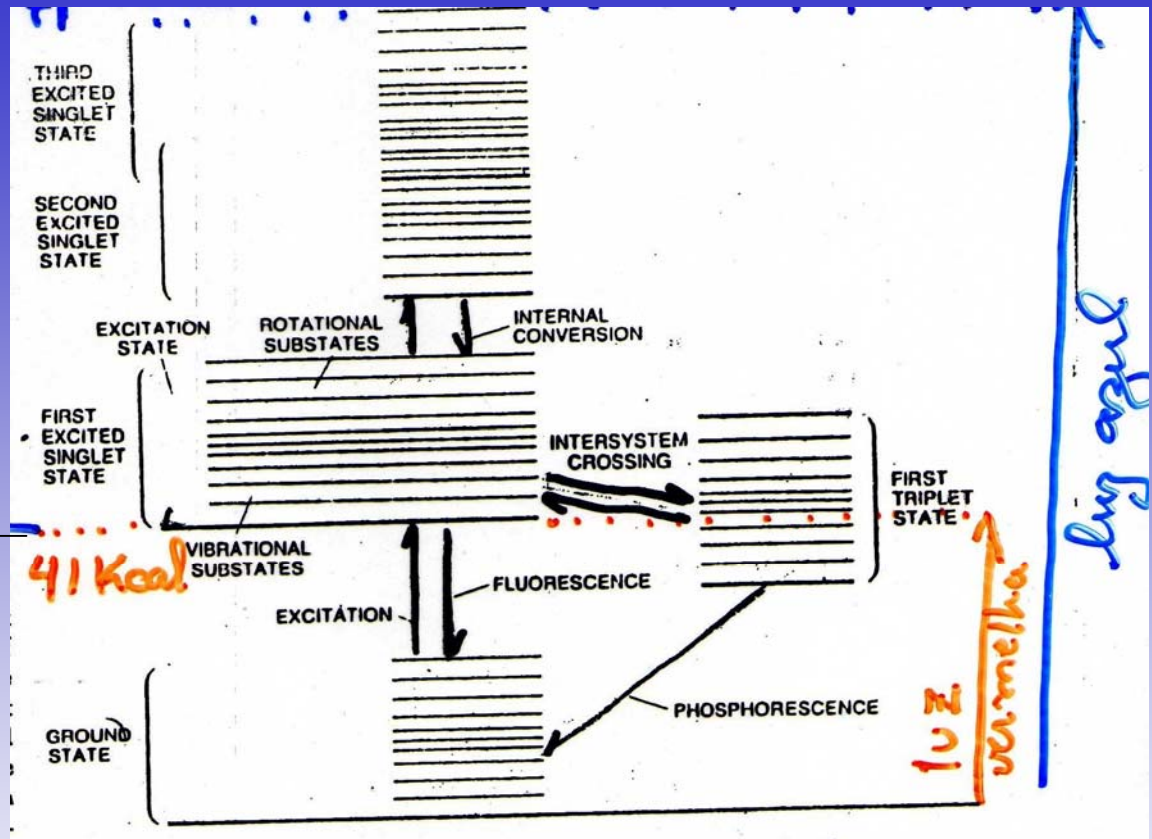
Para impulsionar um elétron, um fóton deve ter uma Q certa de E (impulso funciona na base do **tudo ou nada**).

Tempo necessário → ordem de 10^{-15} s.





Eventos fotoquímicos
(Apenas cl-a do CR)



a Q de energia absorvida (éxciton) → liberada sob a forma de luz ou direcionada aos eventos fotoquímicos.

fluorescência (decaimento rápido: 10-12 s) ou
fosforescência (decaimento lento).

In vitro: molécula de clorofila excitada libera E como fluorescência.

In vivo → fluorescência mínima é observada

Porque? Eventos fotoquímicos: éxcitons são expelidos da clorofila excitada e "mergulham" no acceptor primário → primeiro membro de uma cadeia de transportadores de elétrons.

Apenas os e^* (éxcitons) **excedentes** do processo é que têm sua E transformada em fluorescência, que, neste caso, então, é muito pequena.

Portanto, a fluorescência representa energia desperdiçada ou excedente do processo fotossintético.

Células íntegras → cerca de 10% da energia que não entra na cadeia de transporte de elétrons é liberada como fluorescência.

"In vitro", essa E é diretamente proporcional à clorofila disponível.

Essa é a base do método para estimar biomassa por fluorescência.

Transferência de E

O e^* pode ser transferido entre pigmentos do fotossistema seguindo uma seqüência determinada:

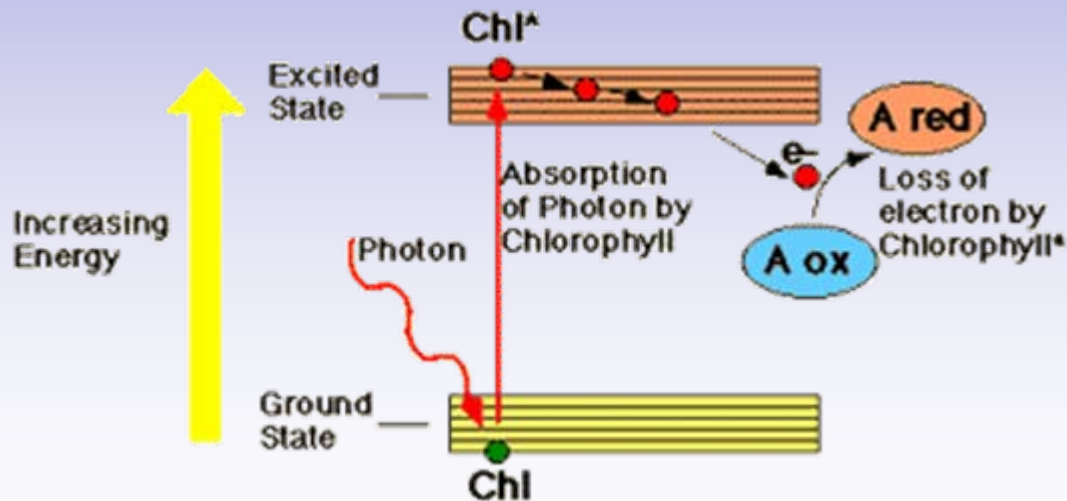
carotenóides $\rightarrow$ biliproteínas $\rightarrow$ clorofila-a $\rightarrow$ centro de reação

ou clorofila-b $\rightarrow$ clorofila-a $\rightarrow$ centro de reação.

Essa transferência → por ressonância magnética (pigmentos não perdem seus elétrons).

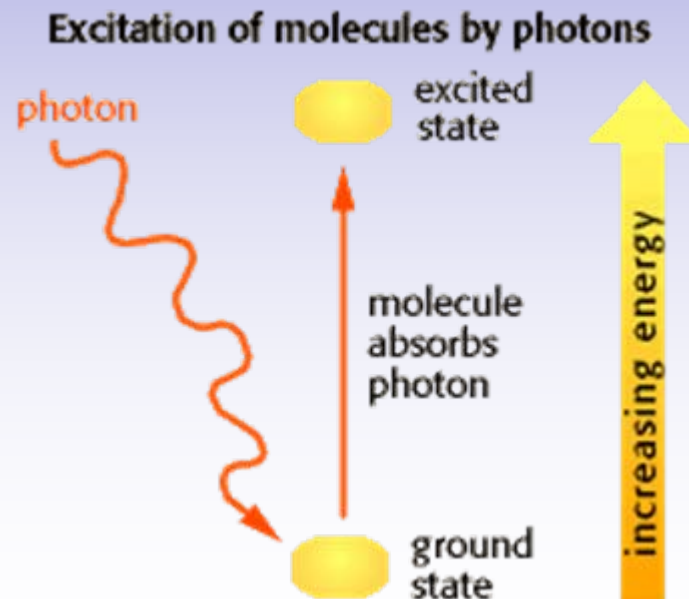
Isto ocorre até que o CR (cl-a especial) receba o e^* .

- **Conversão da E luminosa em E química: Transdução**
- Ocorre quando uma molécula de clorofila especial do CR é excitada e perde um e^- , sofrendo oxidação.



Transferência de energia

A E do fóton se encontra armazenada no e^* perdido pela clorofila do CR



- **Evento primário na fotossíntese**
- A E luminosa excita um e^- do P680 (Fotossistema II) ou do P 700 (fotossistema I) para um nível maior de E.
- O poder redutor desse elétron aumenta cerca de 1 volt. Dentro de um bilionésimo de segundo a molécula de pigmento sofre reação de oxidação.



Fluxo descendente de e^- :

Após o CR tornar-se oxidado, isto é, perder um e^-

→ Ocorre uma redução correspondente de um aceptor de e^- na membrana do tilacóide.

→ após chegar ao primeiro aceptor → transferência de e^- "morro abaixo": elétron perde E conforme passa para diferentes aceptores.

→ Na transferência: produção de NADPH e ATP, moléculas ricas em E

Para que os transportadores possam atuar como tal, entretanto, é preciso que estejam nas posições corretas espacialmente → orientação espacial:

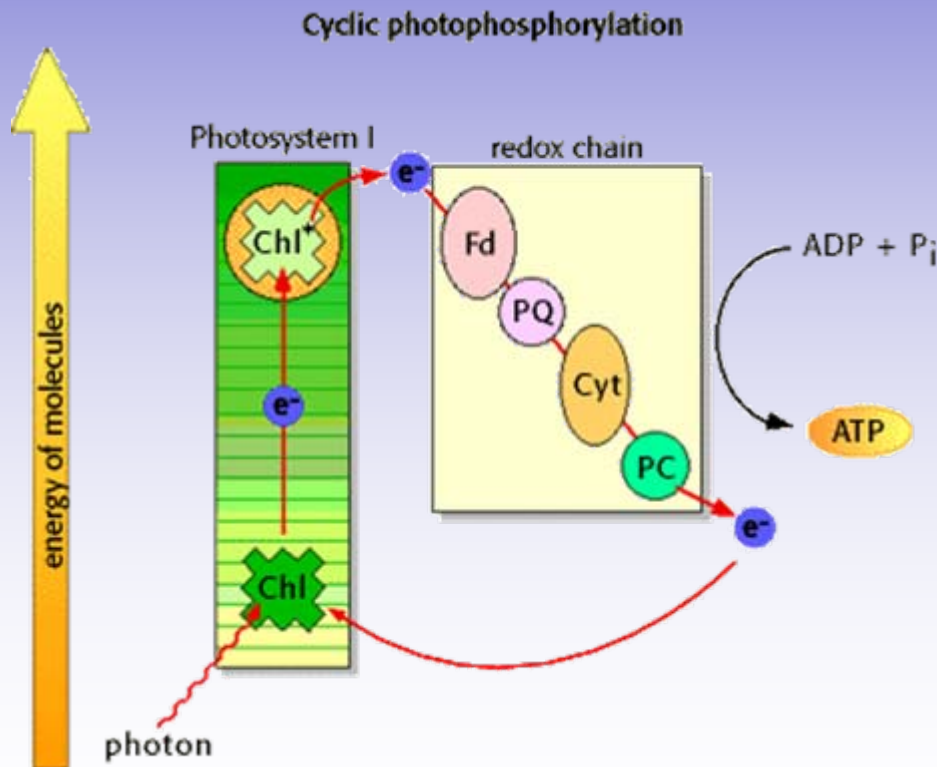
Membrana com "direito " e "avesso".

*Como o elétron vacante do centro de reação é substituído?
E como podemos explicar a produção de oxigênio a partir da água?*

Sistemas de transporte de elétrons não cíclico e cíclico

Nas bactérias com fotossíntese anoxygenica: apenas PS-I → transporte cíclico de e⁻.

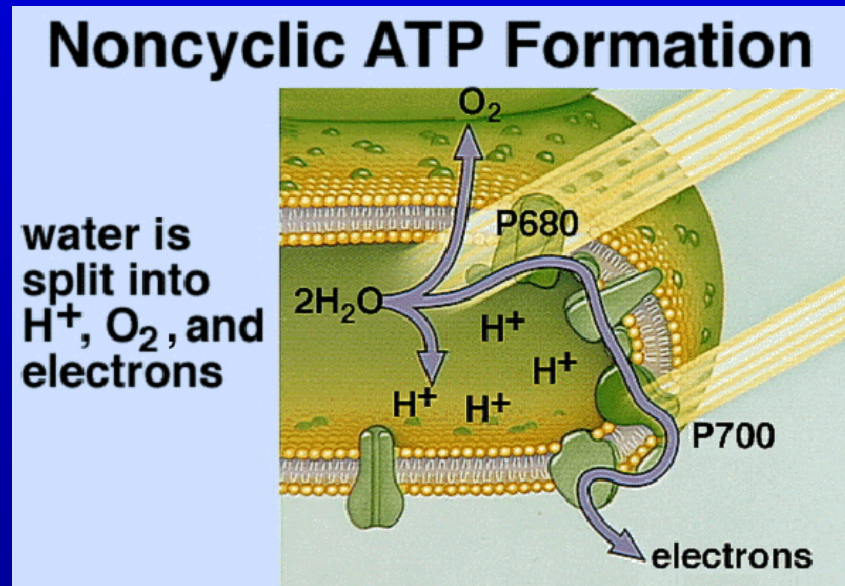
- Fotofosforilação cíclica requer o Fotossistema I (P-700), mas não o Fotossistema II.
- O transporte de e⁻ dependente da luz ocorre na membrana do tilacóide, onde e⁻ segue um ciclo retornando ao CR do Fotossistema-I



Os e- descem através dessa cadeia para o CR do PS-I, direcionando o transporte de prótons através da membrana do tilacóide e fornecendo energia para geração de **ATP a partir de ADP + Pi**.

Neste caso nenhuma água é quebrada e nenhum NADPH é produzido. **O único produto é o ATP.**

- Nos organismos de fotossíntese oxigênica:
- → PS-I opera em pequena escala
- → PS- I e PS-II operam **em série:**
fosforilação não cíclica.



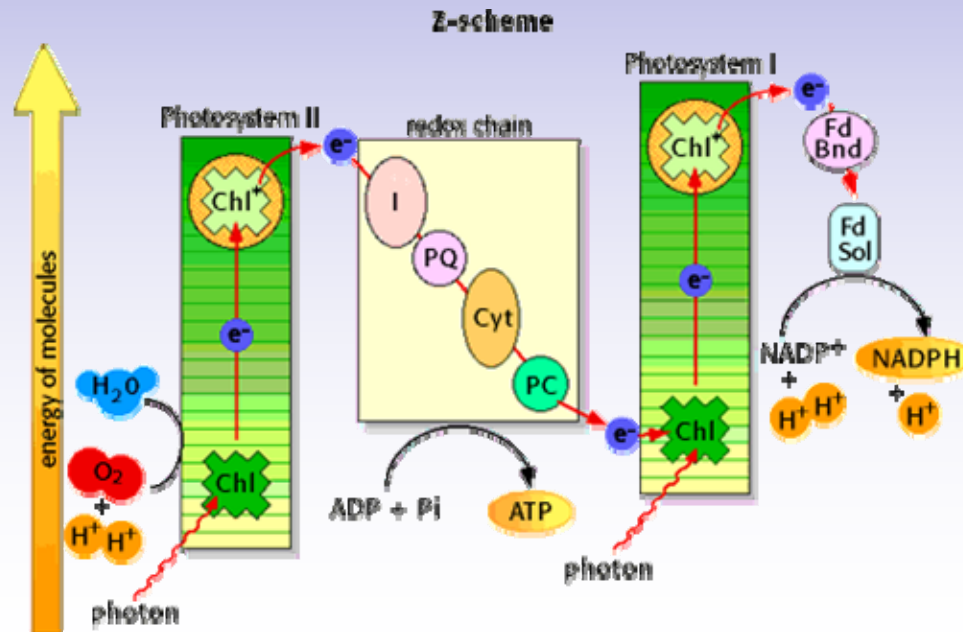
Fosfoforilação não cíclica

Água é quebrada no lúmen do tilacóide.

A água é oxidada e e^- da água passam através do PS-II e PS-I

Caminho da Transferência de e^-

Cada passo é acoplado a uma reação de oxidação-redução. Do PS-II e^- passam à feofitina (I), plastoquinona (PQ), aos citocromos (Cyt) e plastocianina (PC). Simultaneamente outra reação no PS-I ativa e^- para serem transferidos à ferredoxina e finalmente ao NADP.

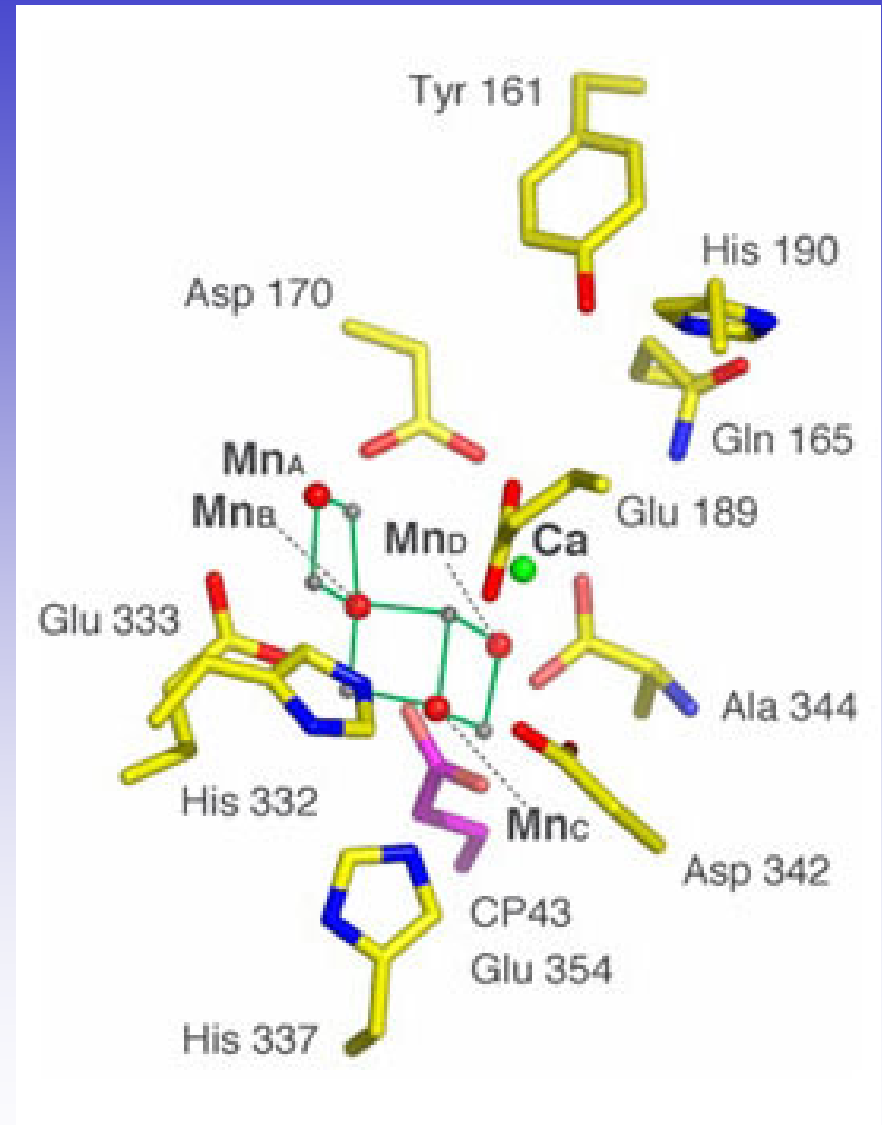
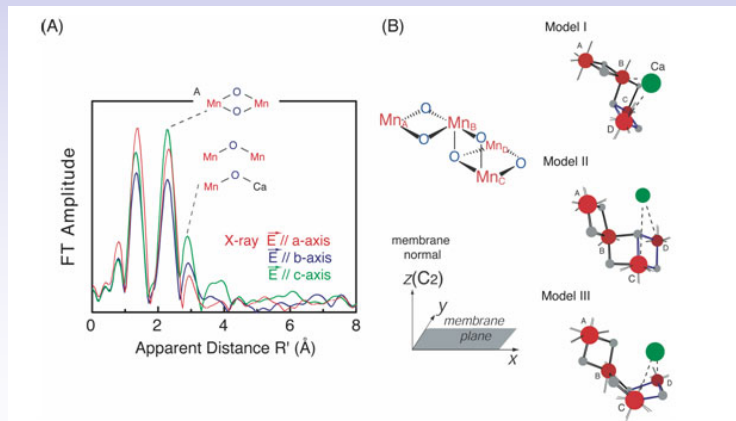


Quebra da molécula da água

Enzima: complexo catalítico Mn_4Ca .

Estrutura provável obtida por absorção de raio X

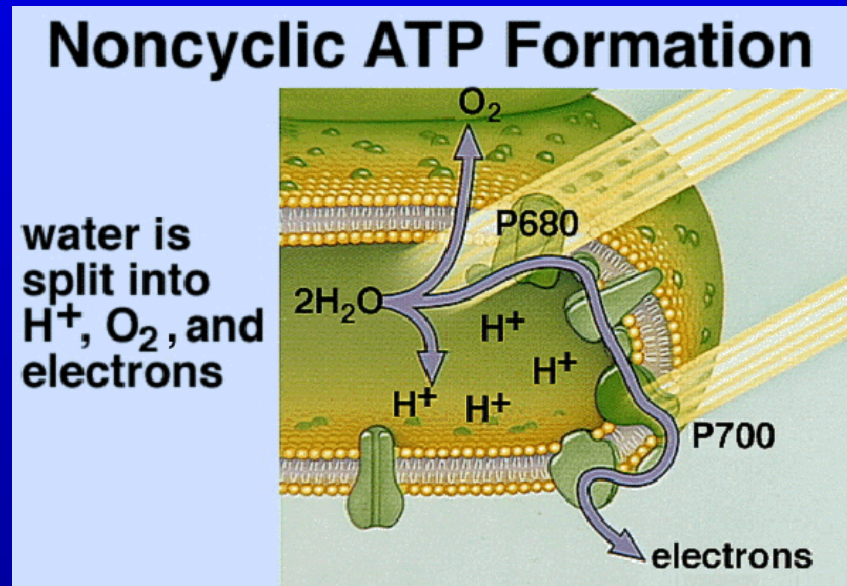
Esferas Mn (vermelho), Ca (verde), O (cinza). Posição dos O é tentativa, baseada na densidade eletrônica do cluster. O complexo pode ser danificado pelo raio-X. (Yano et al., 2006).



Luz excita o P-680 (P-II) → induz quebra da molécula da água.

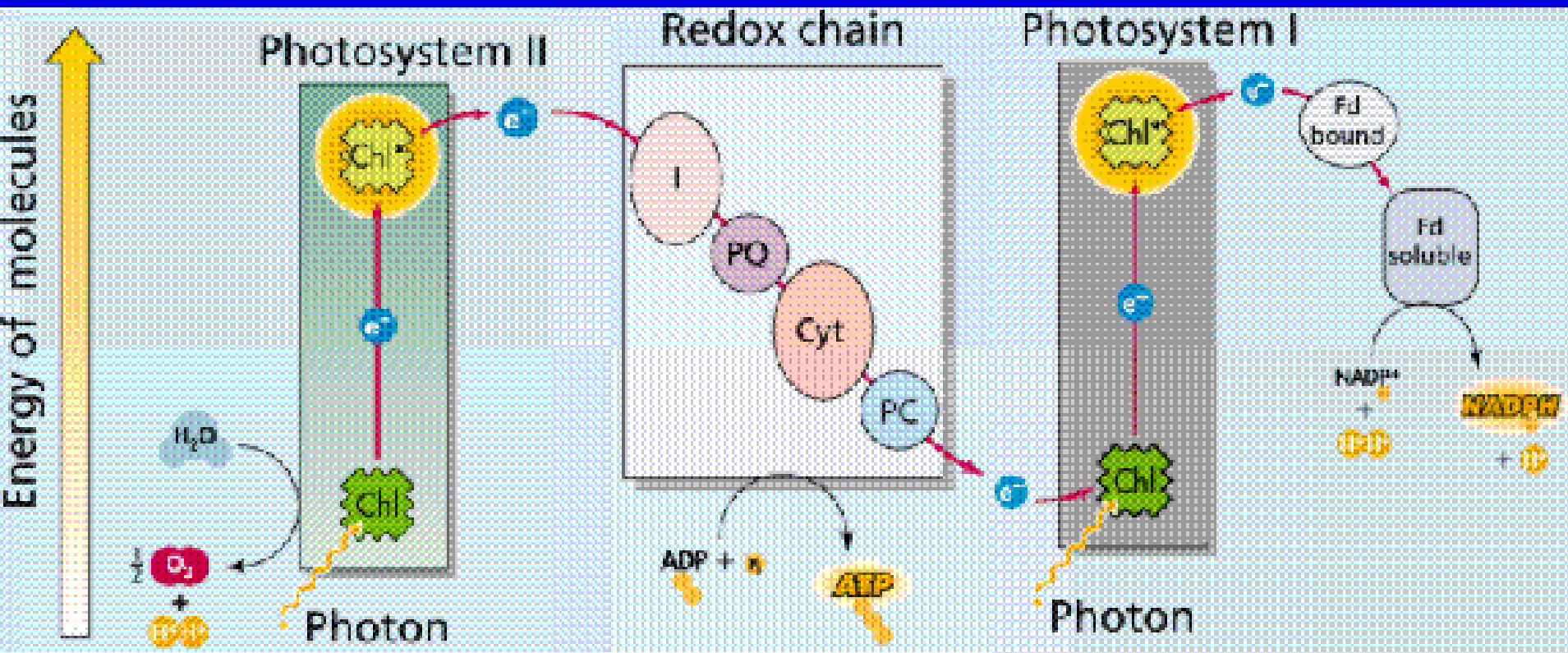
Enzima catalizadora → lúmen do tilacóide, onde os prótons são liberados.

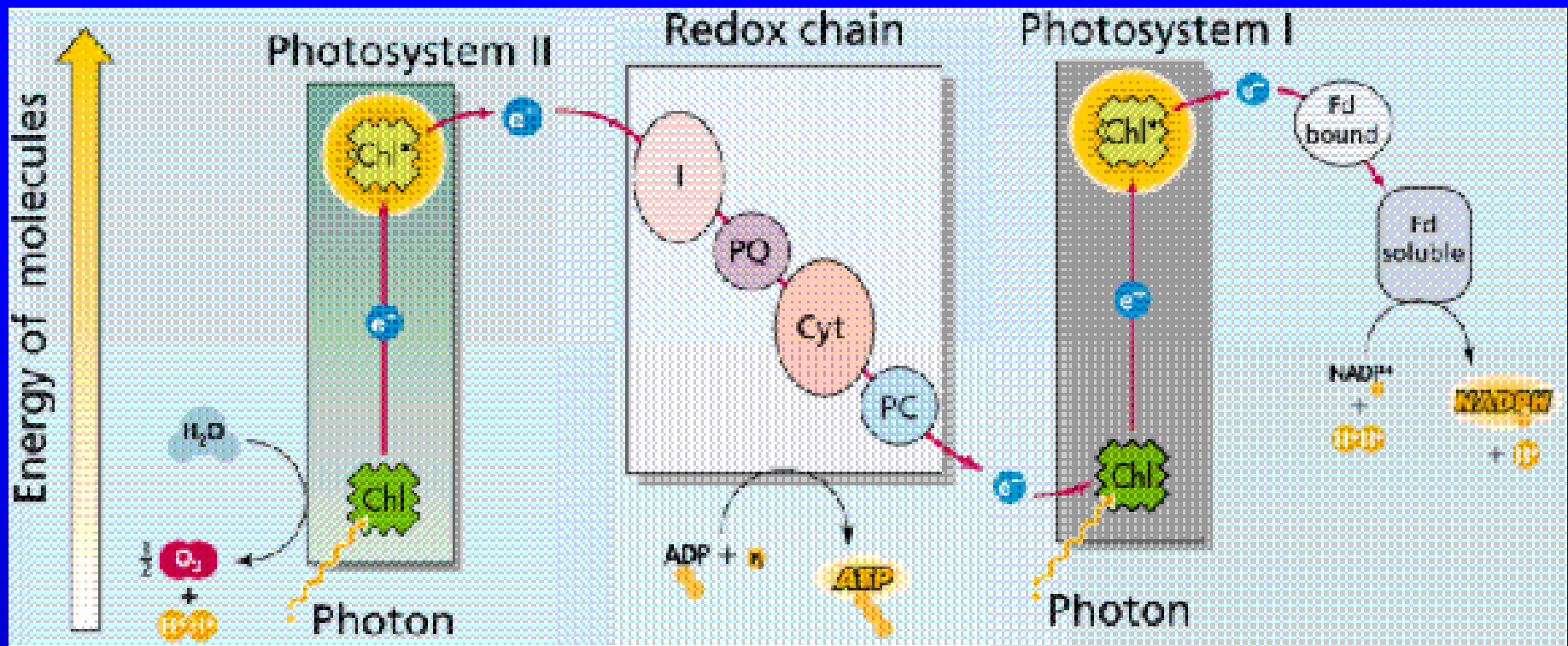
→ cria um gradiente de prótons através da membrana do tilacóide.



e- perde energia conforme desce pela cadeia de aceptores.

e- do P-680 é utilizado para produzir ligação
 $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$, rica em energia

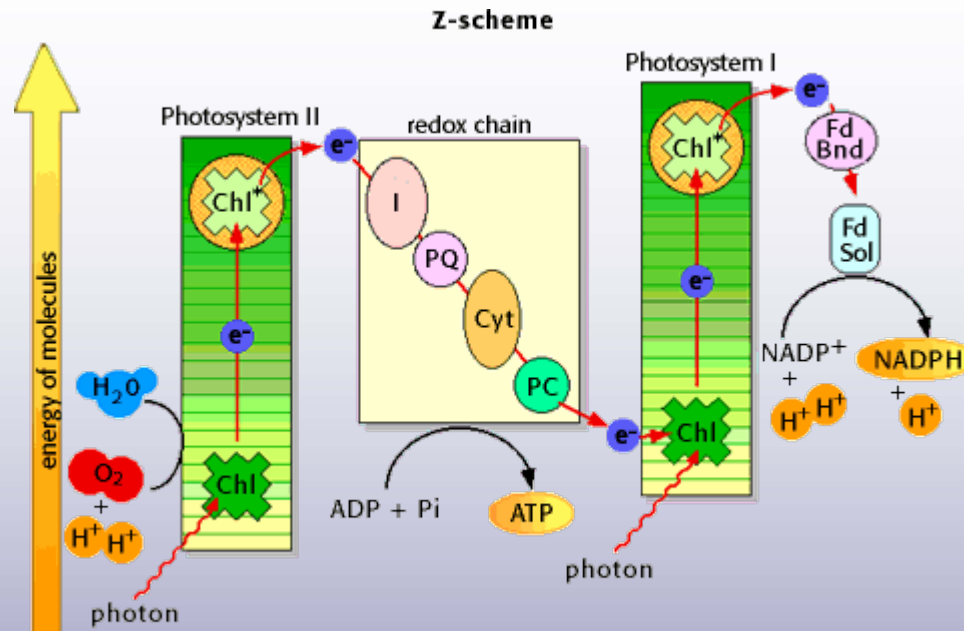




Os e⁻ do P II (P 680) (potencial altamente oxidante) provêm da água.

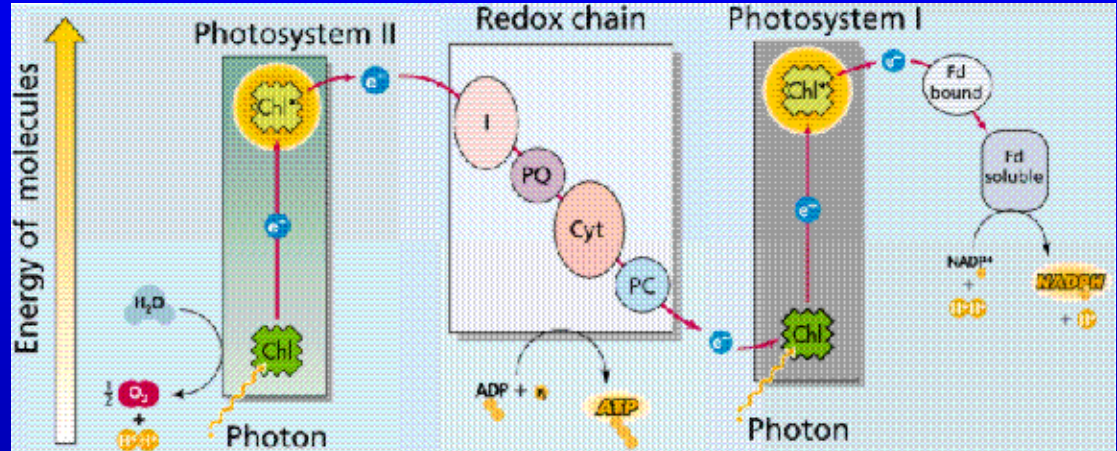
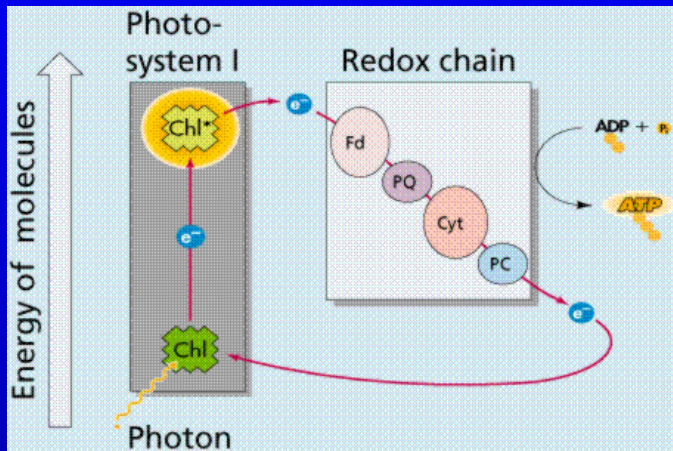
Sob excitação, o P II (P680) alimenta de e⁻ o PI (P700).

No PI e⁻ descem para a co-enzima NADP⁺ que é reduzida a NADPH



Aceptores no PI: ferredoxina e ferredoxina-NADP oxido-redutase. P700 oxidado é reduzido por e⁻ que desceram do F-II.

- P-I quando funciona sozinho produz apenas ATP
- P-I quando funciona acoplado ao P-II produz NADPH+H

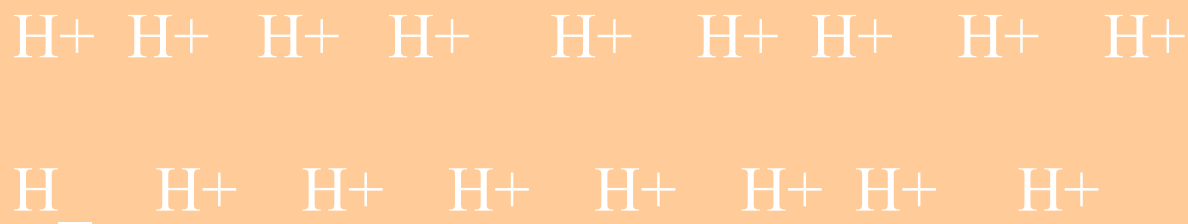
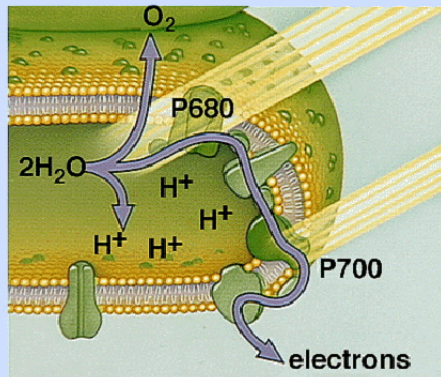


Neste caso reposição de e⁻ é feita pela quebra da H₂O

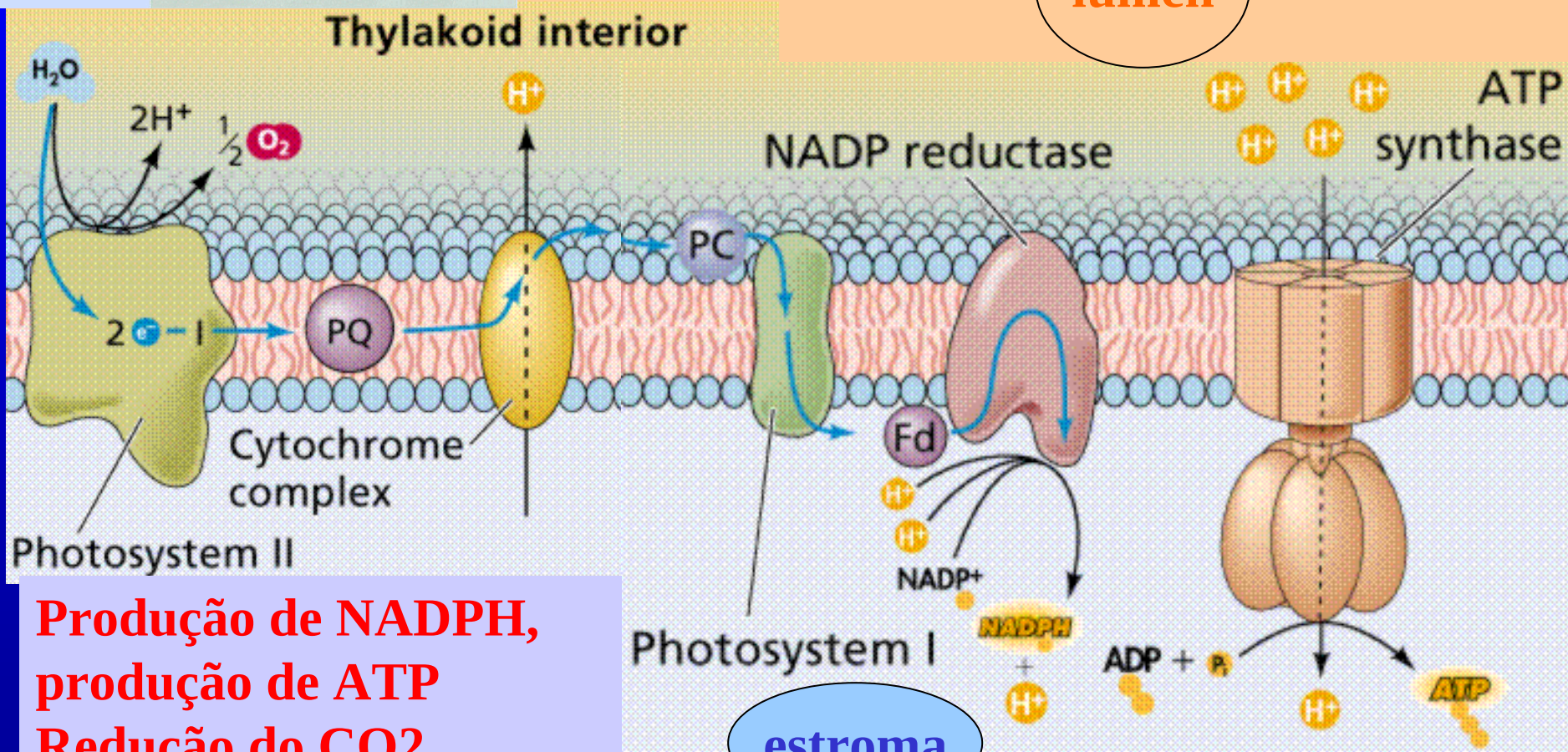
8 quanta luminosos → 1 mol. O₂ + 2 NADPHs + 2 ATPs.
(320 kcal/mol quanta)

Noncyclic ATP Formation

water is split into H^+ , O_2 , and electrons



lúmen

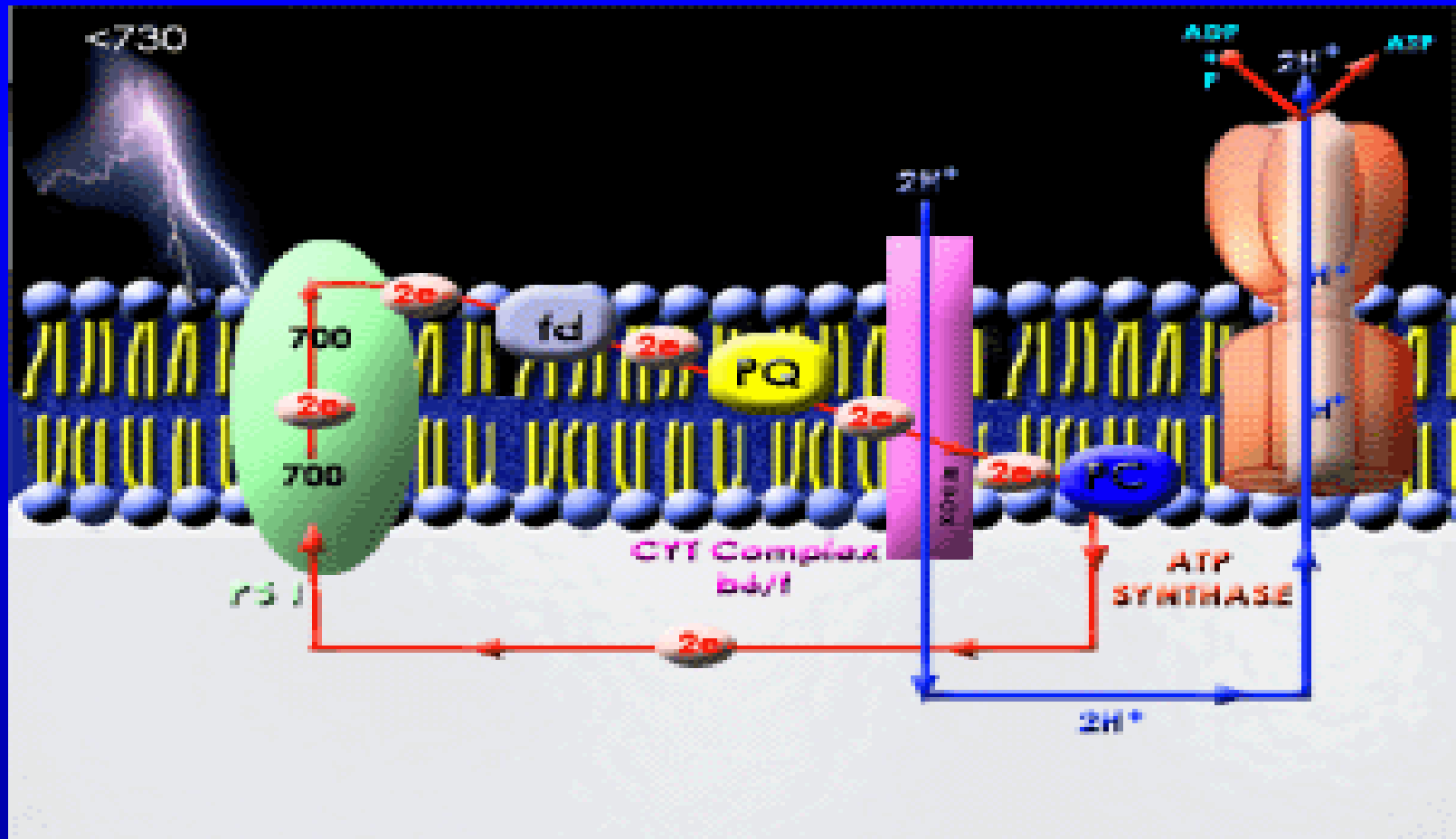


**Produção de NADPH,
produção de ATP
Redução do CO2**

estroma

Bomba de protons

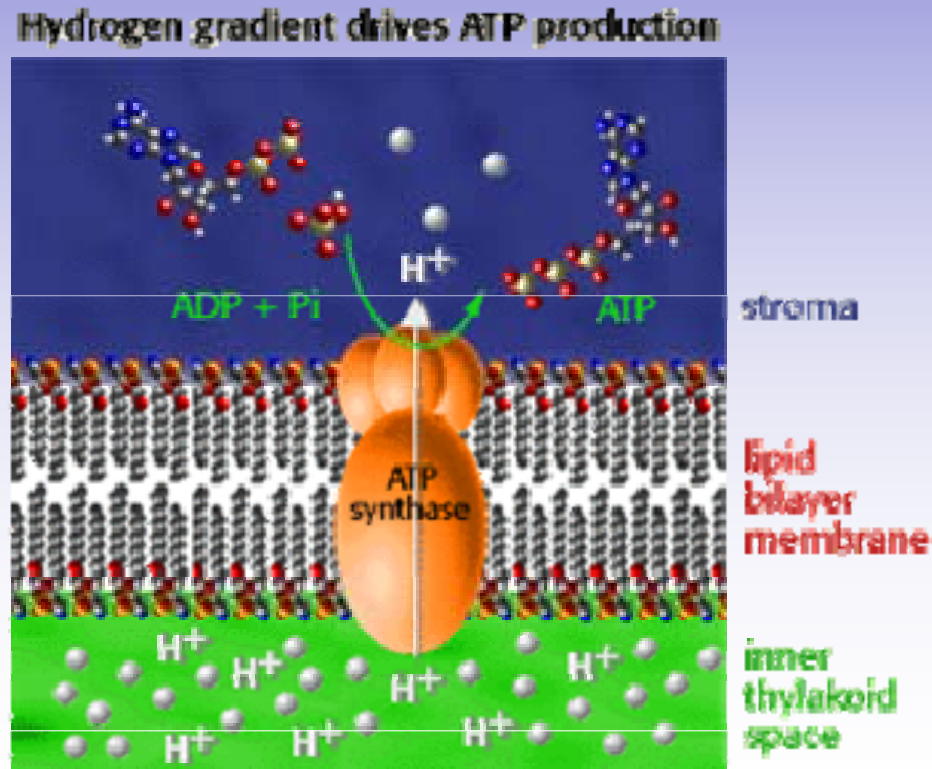
Fotofosforilação cíclica



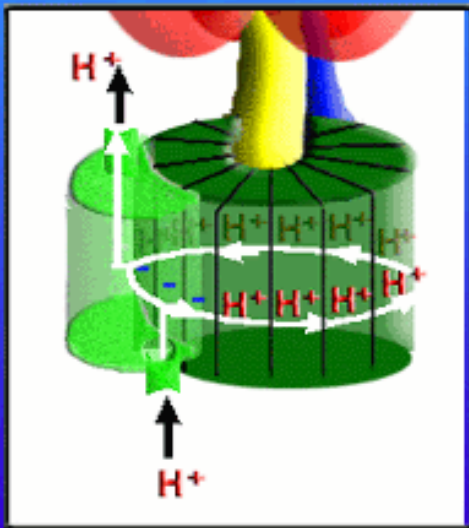
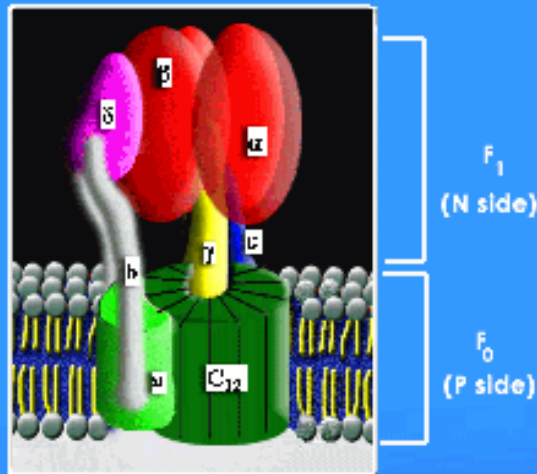
Permite que os prótons fluam livremente gradiente abaixo de volta para o estroma do cloroplasto.

Durante o Transporte de e^- → acúmulo de prótons no lúmen do tilacóide.

A E estocada é usada por um complexo de proteínas ligadas à membrana (**ATP-sintase**) para ligar de modo covalente um grupo fosfato (P_i) à adenosina di-fosfato (ADP), formando ATP.



ATP synthase



Os prótons passam por um canal onde a **E eletroquímica livre** se transforma num tipo de **E potencial de transferência de grupo fosfato** (ligação P_i de alta E)(Klotz, 1967).

Análogo à síntese de ATP nas mitocôndrias, mas é chamado fotofosforilação (a luz provê a E).

A E estocada no ATP pode ser transferida para outra molécula → transferência do grupo fosfato.

Reações luminosas → conversão de E radiante em E livre redox na forma de NADPH e em E de transferência de grupo fosfato na forma de ATP.

->Produção de E como ATP é provavelmente o processo mais primitivo

→é o único sistema das bactérias

→ pode ser encontrado também nos eucariotos (vegetais e algas).

Transportadores de e^- → complexos de íons metálicos e grupos aromáticos ligados a proteínas.

→ cadeias de polipeptídeos que se enlaçam através da membrana → armação estrutural para os íons metálicos e grupos aromáticos.

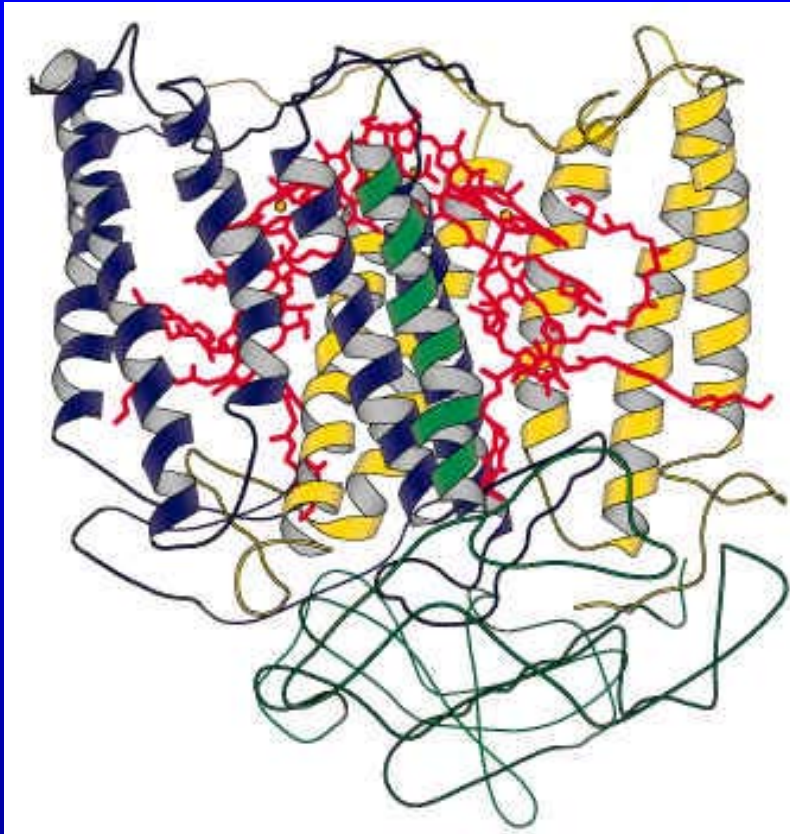
Estrutura molecular de um centro de reação bacteriana.

Co-fatores: vermelho.

As três proteínas do CR azul, amarelo e verde.

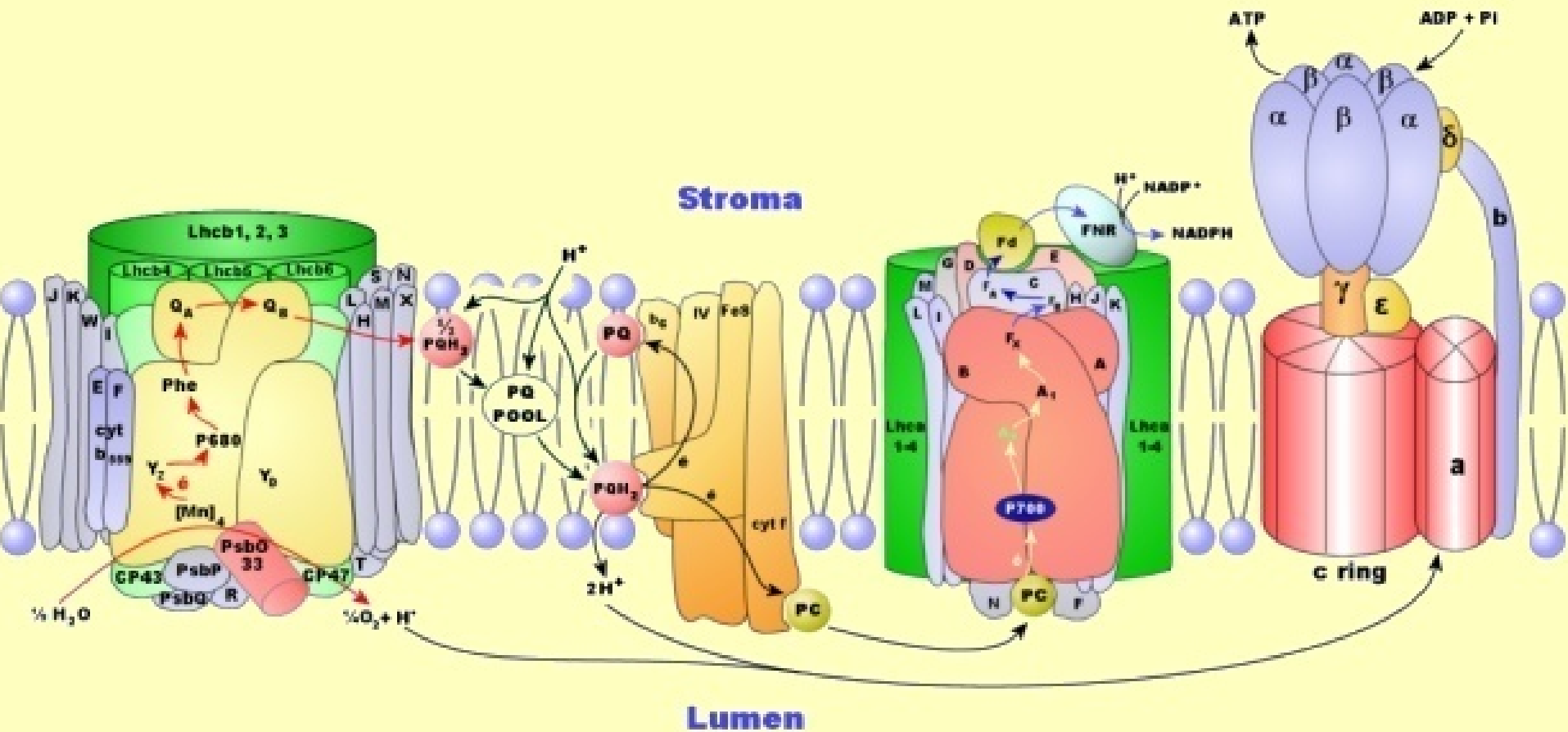
hélices → regiões na membrana.

“arames” → domínios fora da membrana. (Dr. Jim Allen).



- Estoque de E pela fotos. bacteriana
→ apenas de 7kcal/mole de CO₂.
- Estoque de E pela fotossíntese oxigênica:
320 cal/mol de CO₂.

Transferência de e⁻: controlada pela distância entre proteínas e E livre.



Alguns transp. móveis de e^- , operando entre complexos de proteínas.

ex: a plastoquinona e o NADP $\rightarrow$

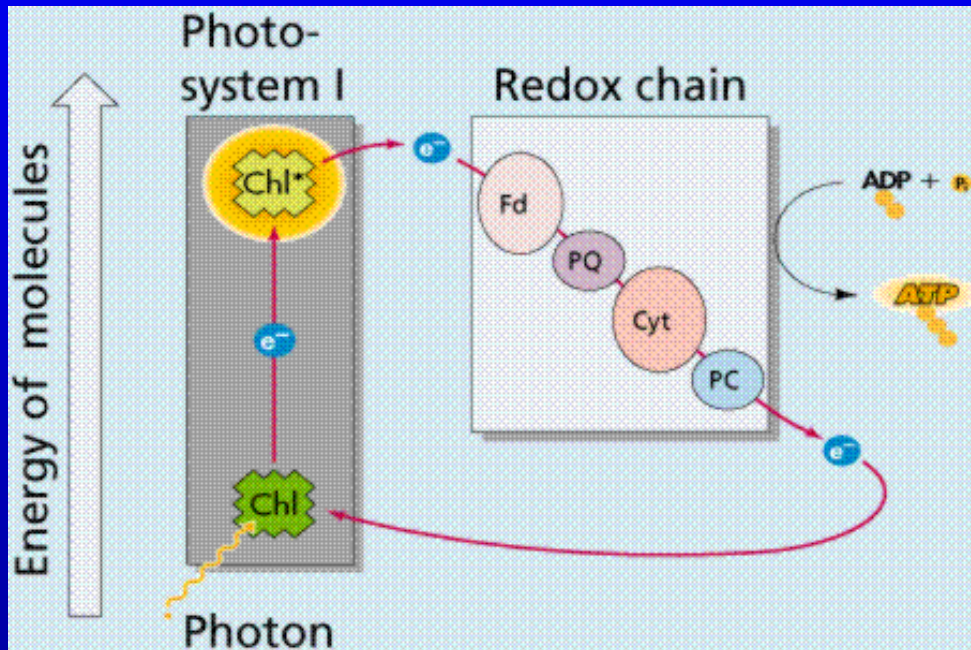
Precisam se ligar a sítios específicos nas proteínas (*binding sites*).

controle da taxa e caminho da transferência de elétrons.

A energia total da fotofosforilação **não cíclica** :

6 e⁻ da H₂O → **6 ATP + 6 NADPH**

Mas as reações de fixação de C requerem **mais ATP** do que NADPH.



Portanto, a fotofosforilação **cíclica** é uma **necessidade** de todos os que fazem fotossíntese oxigênica para **completar** os requisitos do Ciclo de Calvin.

- A Equação abaixo sumariza os eventos da fase luminosa da fotossíntese



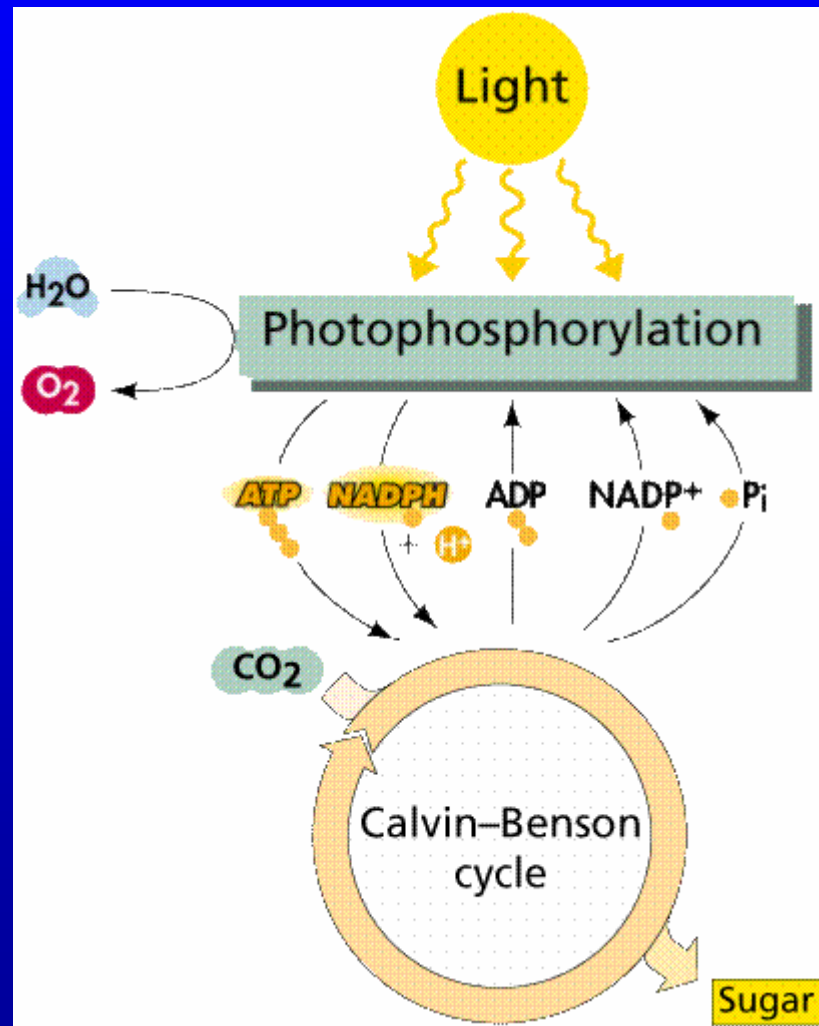
Oxidação da água

Redução do NADP^+ a NADPH

Síntese de ATP a partir de ADP e Pi

Ciclo de Calvin ou ciclo dos ácidos tri-carboxílicos.

-> redução do carbono fotossintético



Fase escura

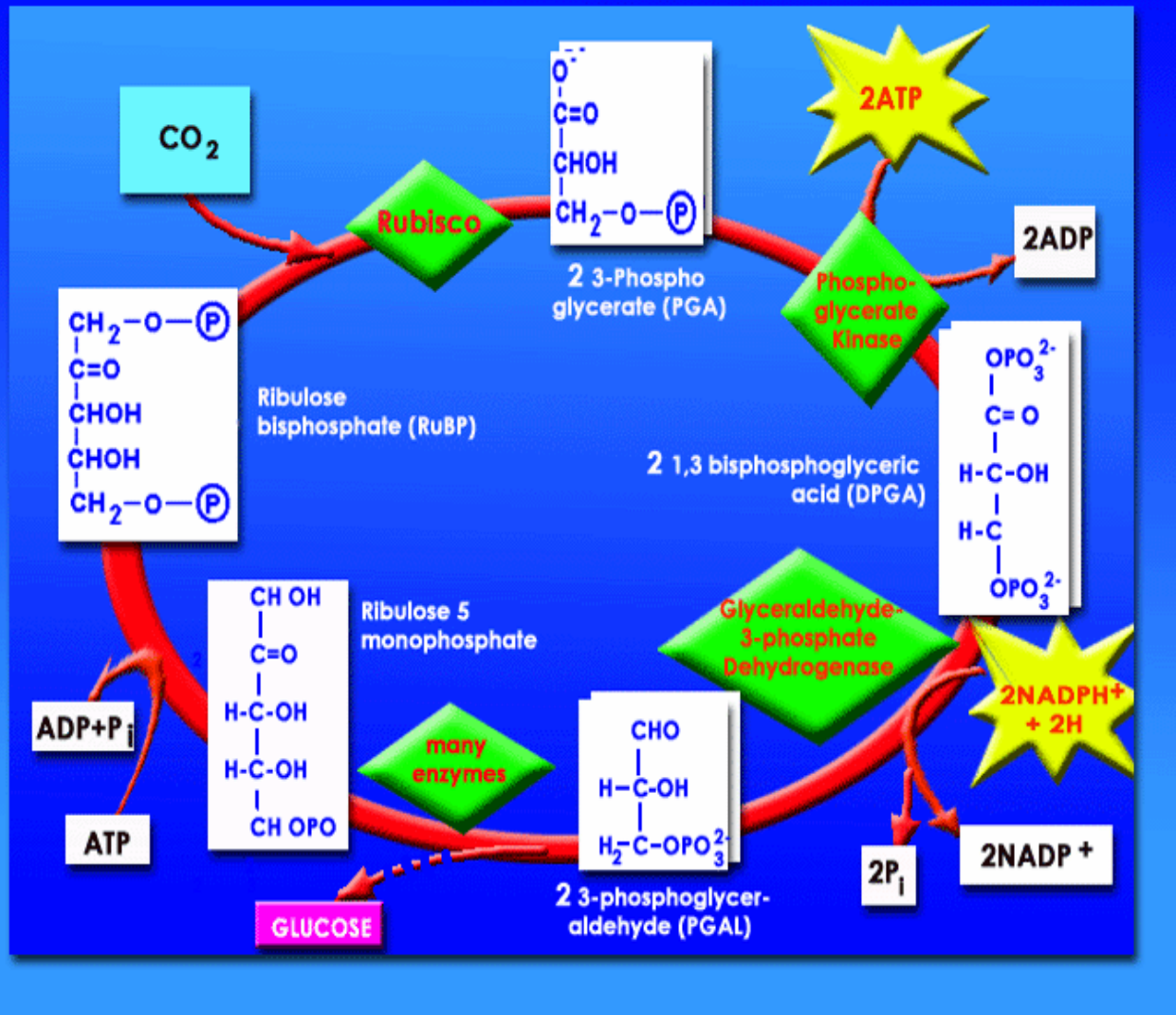
O CO_2 penetra nas células do fitoplâncton por simples difusão.

A redução do CO_2 a carboidrato ocorre estroma → (externo ao tilacóide) e envolve uma série de reações enzimáticas.

Estágio 1 → catalizado pela enzima Rubisco (D-ribulose 1,5,-bifosfato carboxilase/oxigenase), a qual liga o CO_2 a um composto de 5 carbonos (carboxilação).

Rubisco → enzima mais abundante
(40% das proteínas totais das folhas).

CALVIN CYCLE



A reação produz 2 moléculas de um composto de 3 C (3-fosfoglicerato ou PGA).

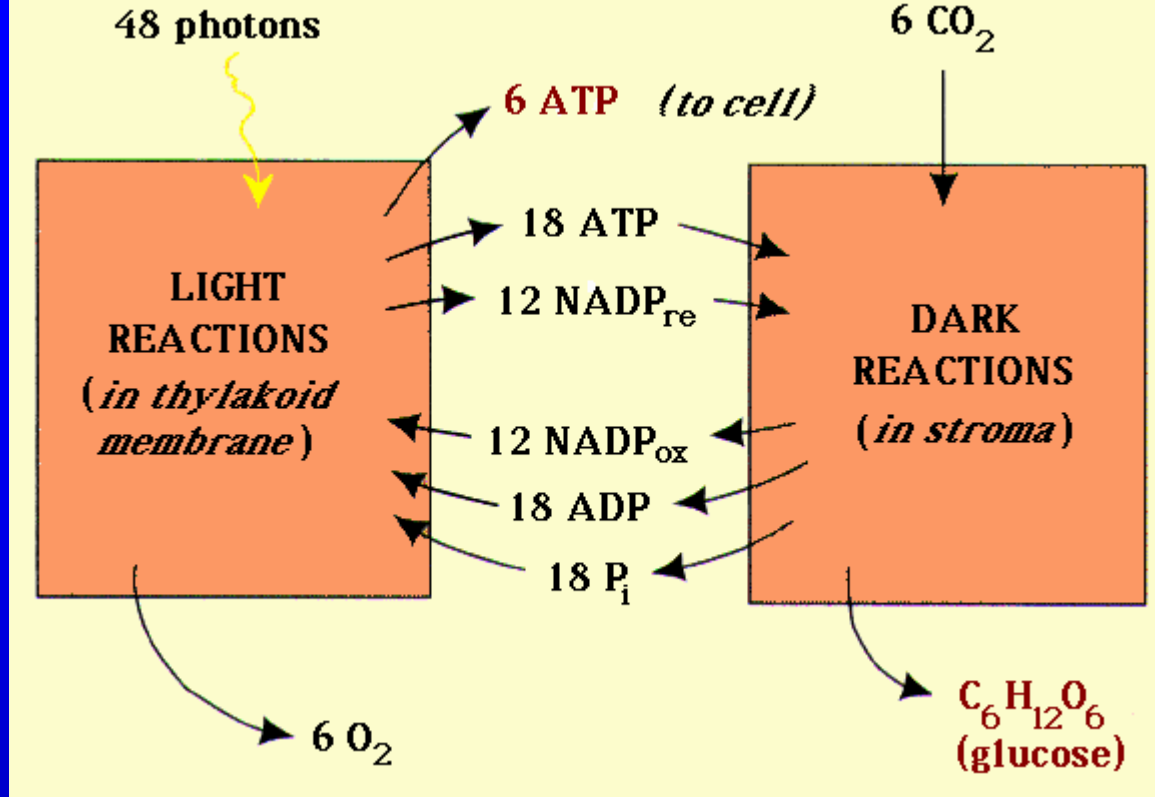
Estágio 2: PGA convertido em outra molécula de 3 C → ácido 1,3 bifosfoglicérico (DPGA).

As reações seguintes → reduzem o C por transferência de hidrogênio.

Estágio 3 → moléculas de DPGA reduzida a trifosfogliceraldeído (PGAL)

Estágio 4 → PGAL utilizado para regenerar a D-ribulose 1,5 - bifosfato, a molécula inicial.

A maior parte do C é transformada em sacarose ou amido, às expensas de ATPs e NADPHs produzidos nas reações luminosas.



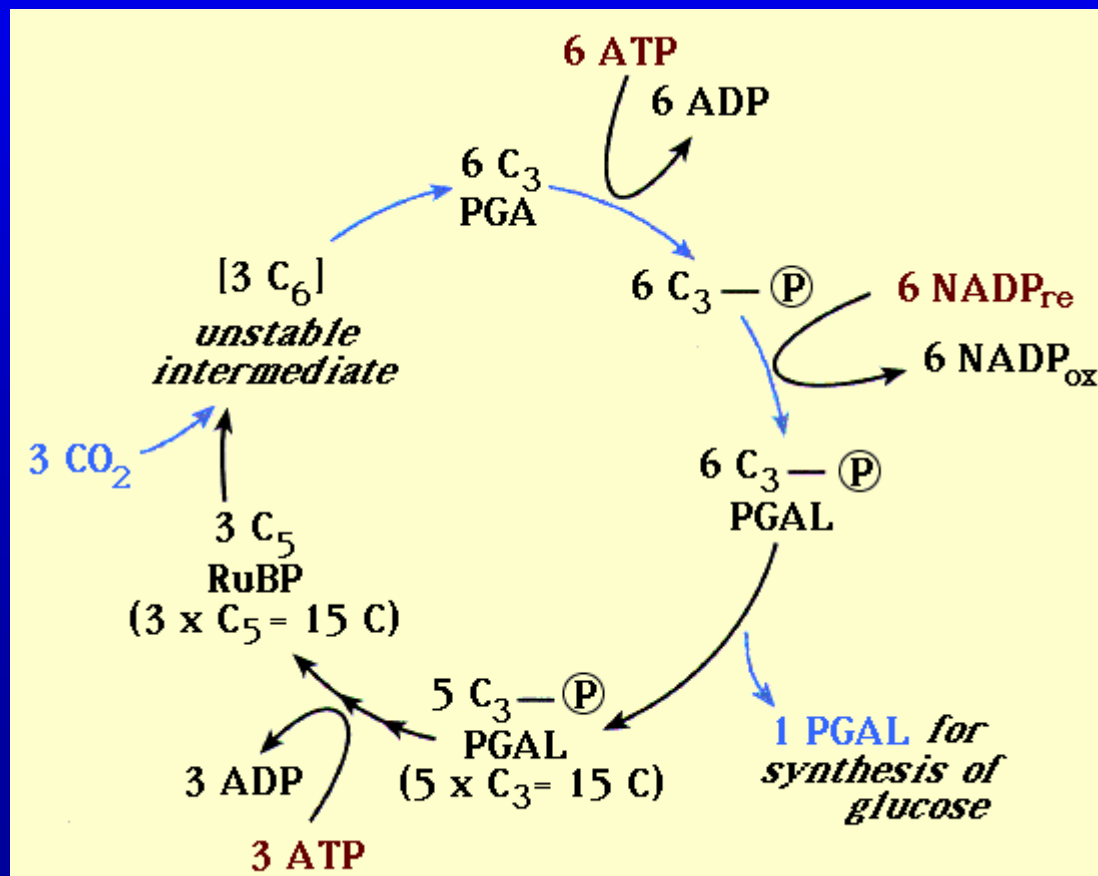
São necessárias 6 voltas do ciclo para produzir uma molécula de glicose e para isso são necessários 48 quanta.

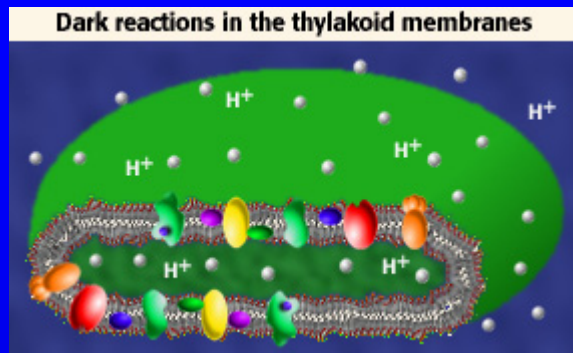
São gastos 18 ATPs e 12 NADPHs. (Maior quantidade de ATP do que NADPH, por isso a importância da fotofosforilação cíclica).

O ciclo de redução do C $\rightarrow$ apenas transferência e rearranjo de E química.

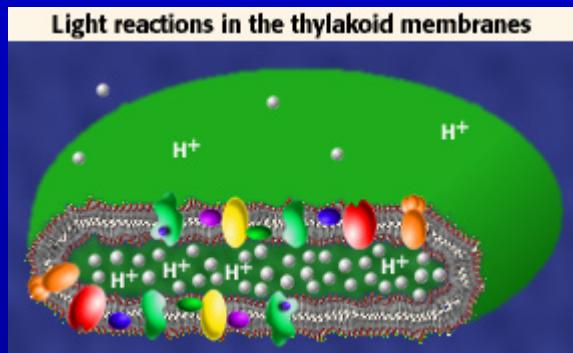
Portanto, a produção de O_2 e a produção de MO são eventos distintos e separados no tempo.

A regulação do ciclo, entretanto, é feita pela luz.





- Enzimas do transporte de e^- são proteínas de membrana.
- No escuro, íons H^+ são igualmente distribuídos entre estroma (fora) e lúmen do tilacóide (dentro)



Nas reações de luz, proteínas de membrana bombeiam prótons (H^+) através da membrana do tilacóide durante o transporte de e^- luz-dependente.

A concentração de H^+ pode ser cerca de 1000 $\times$ dentro dos tilacóides que fora.

Plantas C3 e C4

Plantas C-3- primeiro produto formado no ciclo de carboxilação é o PGA- ácido trifosfoglicérico, de 3 C.

Plantas C-4, quando o primeiro produto é um composto de 4 C: oxalacetato. (na realidade, todas as plantas C-4 apresentam a via C-3, a C-4 é adicional)

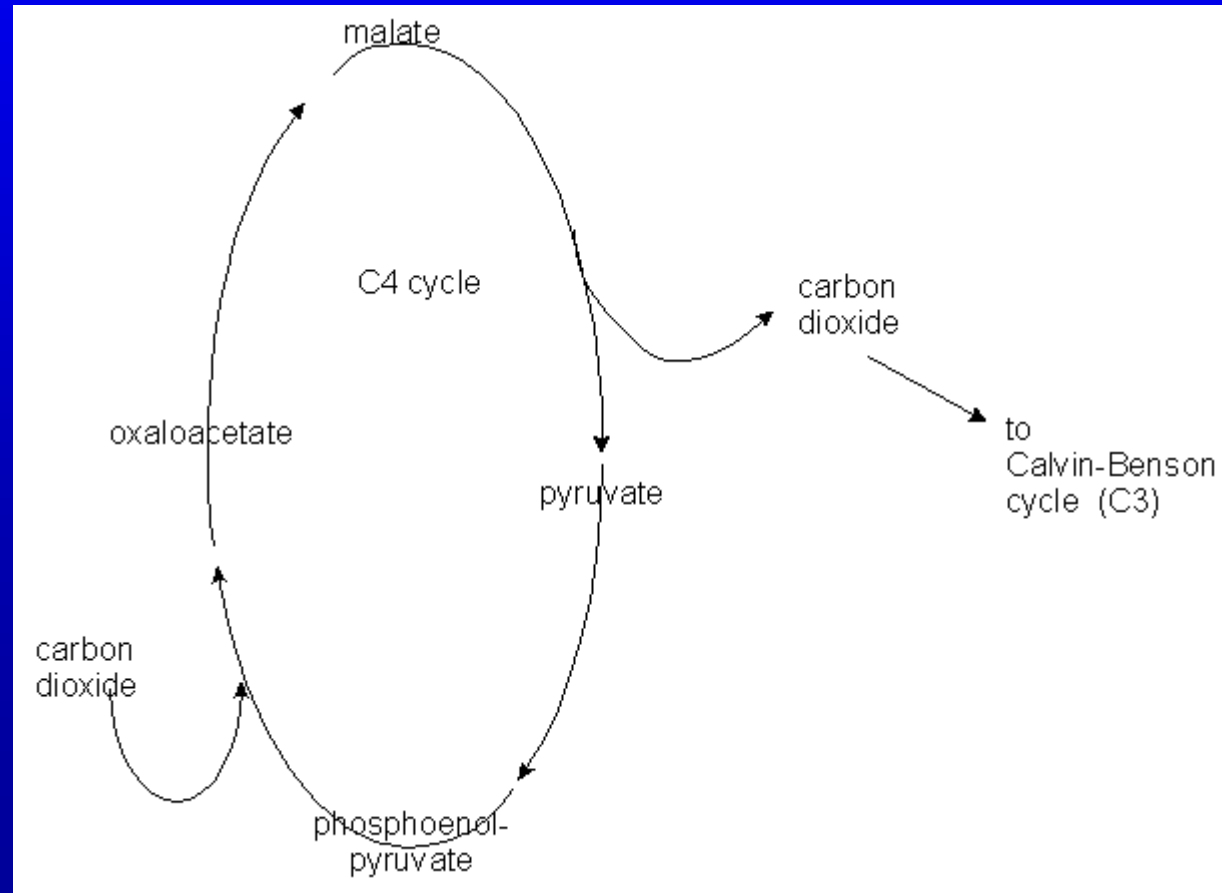
Via descoberta posteriormente à dos ácidos tri-carboxílicos (Via de Hatch-Slack).

Específica para alguns grupos de vegetais, como cana de açúcar, milho, capins diversos (muitas plantas tropicais, que crescem juntas, sob altas temperaturas).

Fixação do $\text{CO}_2 \rightarrow$ no fosfoenolpiruvato (3 C), através da fosfoenolpiruvatocarboxilase (PEP-carboxilase) para produzir oxalacetato.

PEP-carboxilase tem maior afinidade ao CO_2 que a Rubisco

Piruvato é transportado e volta para produzir PEP pela PEP quinase



Porque vegetais desenvolveram essa via?

Rubisco- Enzima bi-funcional: sob baixos níveis de CO_2 , a RuBP é catalizada com O_2 ao invés de CO_2 .

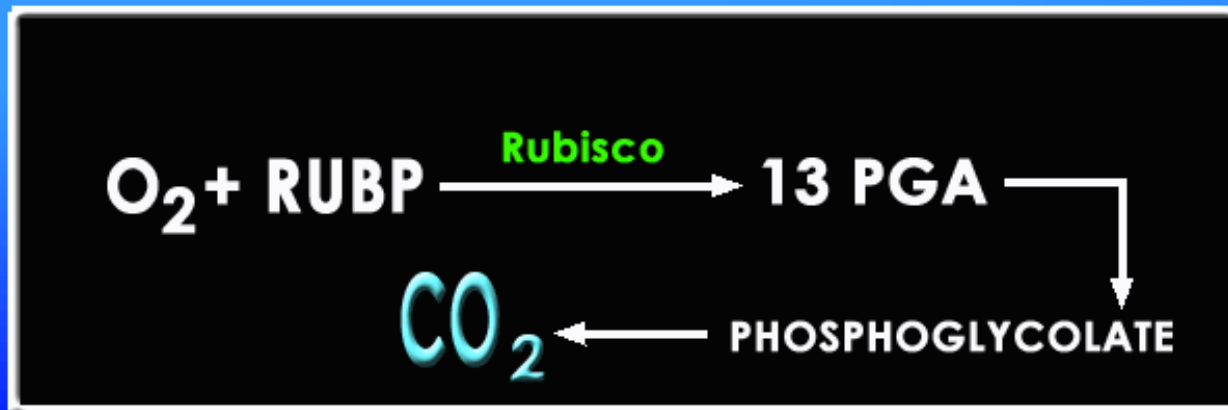
Produto dessa reação $\rightarrow$ ácido glicólico, que pode ser quebrado num processo denominado **fotorespiração**, sem produzir NADH ou ATP, com efeito **desmantelando** o Ciclo de Calvin-Benson.

As plantas C-4 $\rightarrow$ ajuste a níveis baixos de CO_2 pelo aumento "artificial" das concentrações de CO_2 em certas células para impedir a fotorespiração.

Fotorespiração → oxigenação produz ¹³-ácido glicólico que é utilizado no Ciclo de Calvin sem utilidade para a planta.

Fotorespiração serve para recuperar Carbono reduzido e remover fosfoglicolato.

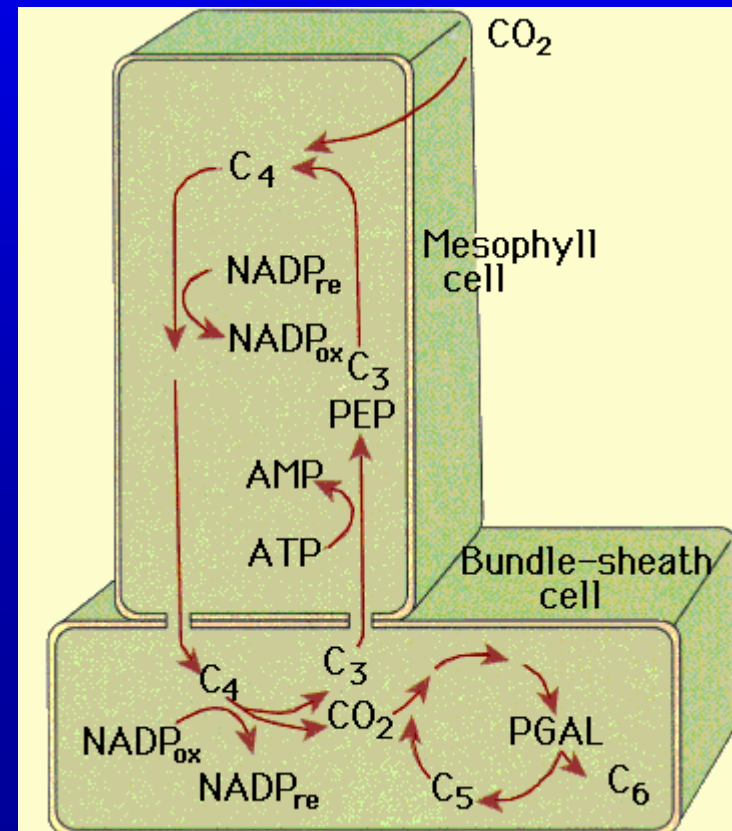
PHOTORESPIRATION

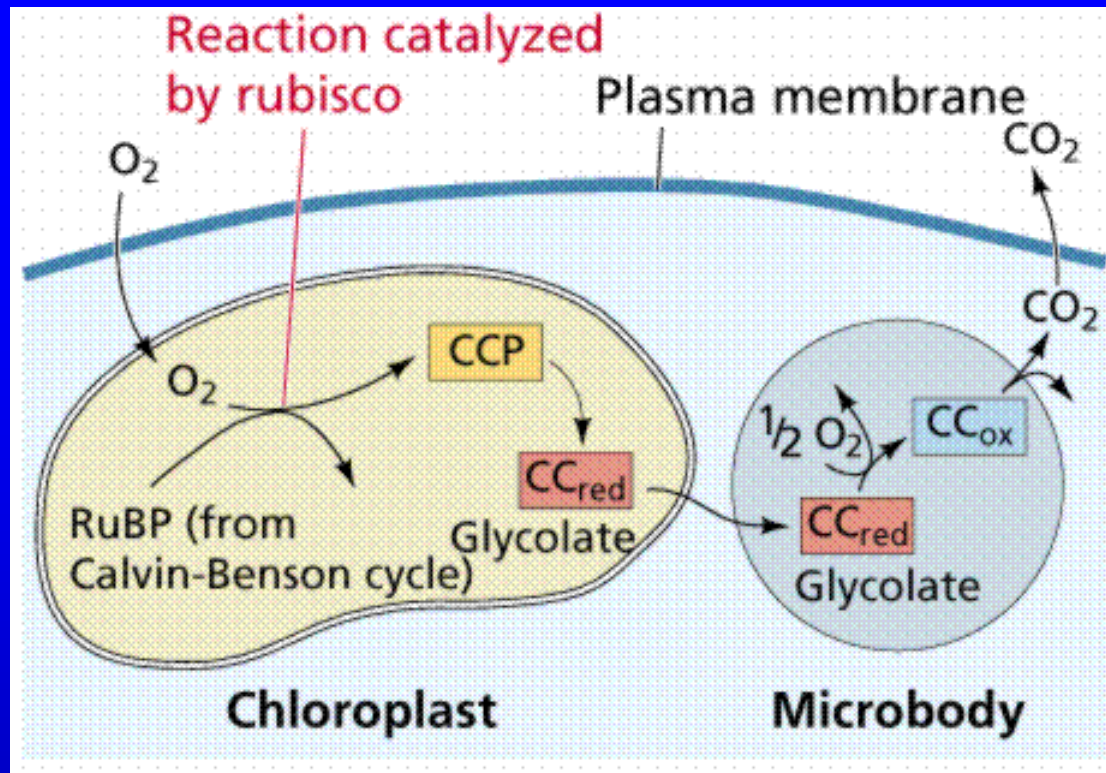


oxalacetato e o malato (Via C-4) têm função em outros processos metabólicos → presentes em todos os vegetais.

→ hipótese → evolução dos mecanismos C-4 ocorreu diversas vezes independentemente, em resposta a condições ambientais semelhantes (**convergência evolutiva**).

Nos vegetais superiores C-4, há células especiais onde ocorre via C-4. Portanto, vias C-3 e C-4 são separadas no tempo e no espaço.





Em 2000, Reifelder e col. Identificaram via C-4 em diatomáceas.

Diatomáceas: via C-4 no citosol e C-3 no cloroplasto.

Via C-4 → atribuída às baixas concentrações de CO_2 no ambiente marinho (durante as florações, principalmente).

Se fotossíntese C4 é comum entre diatomáceas, poderia ser responsável pela alta taxa de fixação de C e exportação nos oceanos.

Leituras adicionais

P.G. Falkowski & J.A Raven- 1997. Aquatic Photosynthesis. Blackwell Science, 375p.

<http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/education/learn.html> excelente . revisto frequentemente. vários níveis

<http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/photoweb/default.html#History>- Fotossíntese na Web- excelente para graduação- muitos links Considero o mais completo

<http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookPS.html> interessante, mais fácil

www.uwgb.edu/dutchs/acstalks/acs-colr.htm
interações da luz com moléculas

http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights_archive/psii-06.html quebra da molécula da água

Fotossíntese no oceano profundo:

<http://www.asu.edu/feature/includes/summer05/readmore/photosyn.html>

Yano, J.; Kern, J.; Sauer, K.; Latimer, M. J.; Pushkar, Y.; Biesiadka, J.; Loll, B.; Saenger, W.; Messinger, J.; Zouni, A.; Yachandra, V. K. Where Water is Oxidized to Dioxygen: Structure of the Photosynthetic Mn₄Ca Cluster (2006) *Science* **314**, 821-825.

Fotossistemas: necessita plug in

<http://www.taylor.edu/academics/acadDepts/biology/energetics/photo.htm>

Muito bem ilustrado

<http://www.geosciences.unl.edu/~dbennett/physiology.html>

Porque estudar a fotossíntese. Ligação com outras áreas:

<http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/study.html>