

Assimilação de nutrientes minerais

AS PLANTAS SUPERIORES SÃO ORGANISMOS AUTOTRÓFICOS que podem sintetizar seus componentes orgânicos a partir de nutrientes inorgânicos obtidos do ambiente. Para muitos nutrientes minerais, o processo envolve a absorção de compostos do solo pelas raízes (ver Capítulo 5) e a incorporação em compostos orgânicos, essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento. Essa incorporação dos nutrientes minerais em substâncias orgânicas como os pigmentos, os co-fatores enzimáticos, os lipídios, os ácidos nucleicos e os aminoácidos, é denominada assimilação de nutrientes.

A assimilação de alguns nutrientes — em particular nitrogênio e enxofre — requer uma série complexa de reações bioquímicas, que estão entre as reações de maior demanda energética dos organismos vivos:

- Na assimilação do nitrato (NO_3^-), o nitrogênio do NO_3^- é convertido em uma forma mais energética, o nitrito (NO_2^-) e, então, em uma forma ainda mais energética, o amônio (NH_4^+), e finalmente em nitrogênio-amida da glutamina. Este processo consome o equivalente a 12 ATPs para cada nitrogênio (Bloom e cols., 1992).
- Plantas como as leguminosas, por exemplo, estabelecem uma relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, para converter o nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3), que é o primeiro produto estável no processo natural de fixação; entretanto, em pH fisiológico, a amônia é protonada para formar o íon amônio (NH_4^+). O processo de fixação biológica do nitrogênio, junto com a subsequente assimilação de NH_3 em um aminoácido, consome cerca de 16 ATPs por nitrogênio (Patê e Lauzell, 1990; Vande Broek e Vanderleyden, 1995).
- A assimilação de sulfato (SO_4^{2-}) no aminoácido cisteína, por meio de duas rotas encontradas nas plantas, consome cerca de 14 ATPs (Hell, 1997).

Para ter-se uma idéia da enorme quantidade de energia envolvida, deve-se considerar que, se essas reações ocorressem rapidamente em reverso — por exemplo, de $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$ (nitrato de amônio) para N_2 — elas se tornariam explosivas, liberando grandes quantidades de energia como movimento, calor e luz. Praticamente todos os explosivos são baseados na rápida oxidação de compostos de nitrogênio ou de enxofre.

A assimilação de outros nutrientes, especialmente os macro e os micronutrientes catiônicos (ver Capítulo 5), envolve a formação de complexos com compostos orgânicos. Por exemplo, o Mg^{2+} associa-se ao pigmento clorofila, o Ca^{2+} associa-se a pectatos na parede celular e o Mo^{6+} com enzimas como a nitrato redutase e a nitrogenase. Tais complexos são altamente estáveis, sendo que a remoção do nutriente do complexo pode resultar na perda total de função.

Este capítulo resume as reações primárias pelas quais os principais nutrientes (nitrogênio, enxofre, fosfato, cátions e oxigênio) são assimilados. Serão enfatizadas as implicações fisiológicas do gasto energético requerido e introduzido o tópico da fixação simbiótica do nitrogênio.

NITROGÊNIO NO AMBIENTE

Muitos compostos bioquímicos presentes nas células vegetais possuem nitrogênio (ver Capítulo 5). Por exemplo, o nitrogênio é encontrado nos nucleosídeos fosfato e nos aminoácidos que formam a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas, respectivamente. Apenas elementos como o oxigênio, o carbono e o hidrogênio são mais abundantes nas plantas que o nitrogênio. A maioria dos ecossistemas naturais e agrários apresnta um expressivo ganho na produtividade após serem fertilizados com nitrogênio inorgânico, atestando a importância desse elemento.

Nesta seção, tanto o ciclo biogeoquímico do nitrogênio. O papel crucial da fixação de nitrogênio na conversão do ni-

trogênio molecular em amônio e em nitrato, quanto o destino do nitrato e do amônio nos tecidos vegetais serão discutidos.

O nitrogênio é transformado em diferentes formas no ciclo biogeoquímico

O nitrogênio está presente em diversas formas na biosfera. A atmosfera contém uma vasta quantidade (cerca de 78% por volume) de nitrogênio molecular (N_2) (ver Capítulo 9). Porém, esse grande reservatório de nitrogênio não está diretamente disponível para os organismos vivos. A obtenção de nitrogênio da atmosfera requer a quebra de uma ligação tripla covalente de excepcional estabilidade, entre os dois átomos de nitrogênio ($N\equiv N$) para produzir amônia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-). Tais reações, conhecidas como **fixação do nitrogênio**, podem ser obtidas por processo industrial e por processo natural.

Sob elevadas temperaturas (cerca de 200 °C) e alta pressão (cerca de 200 atmosferas), o N_2 combina-se com hidrogênio formando amônia. As condições extremas são necessárias para superar a alta energia de ativação da reação. Essa reação de fixação de nitrogênio, conhecida como *processo Haber-Bosch*, é o ponto de partida para a fabricação de muitos produtos para a indústria e agricultura. Indústrias em todo o mundo produzem mais de 80×10^{12} g ano⁻¹ de fertilizantes nitrogenados (FAO-STAT, 2001).

Os processos naturais fixam cerca de 190×10^{12} g ano⁻¹ de nitrogênio (Tabela 12.1) por meio dos seguintes processos (Schlesinger, 1997):

TABELA 12.1
Principais processos do ciclo biogeoquímico do nitrogênio

Processo	Definição	Taxa (10 ¹² g ano ⁻¹) ^a
Fixação industrial	Conversão industrial do nitrogênio molecular em amônia	80
Fixação atmosférica	Conversão fotoquímica e plos relâmpagos do nitrogênio molecular em nitrato	19
Fixação biológica	Conversão do nitrogênio molecular em amônia pelos procariontes	170
Aquisição pelos vegetais	Absorção e assimilação do amônio ou nitrato pelos vegetais	1200
Imobilização	Absorção e assimilação do amônio ou nitrato por microrganismos	N/C
Amonificação	Ação de bactérias e fungos no catabolismo da matéria orgânica do solo em amônio	N/C
Nitrificação	Oxidação bacteriana (<i>Nitrosomonas</i> sp.) do amônio em nitrito e a posterior oxidação pelas bactérias (<i>Nitrobacter</i> sp.) do nitrito em nitrato	N/C
Mineralização	Ação das bactérias e fungos no catabolismo da matéria orgânica do solo em nitrogênio mineral, por meio da amonificação ou nitrificação	N/C
Volatilização	Perda física do gás amônia para a atmosfera	100
Fixação do amônio	Ligação física do amônio nas partículas do solo	10
Desnitrificação	Conversão bacteriana do nitrato em óxido nitroso e nitrogênio molecular	210
Lixiviação do nitrato	Escoamento físico do nitrato dissolvido no lençol de água das camadas superiores do solo e eventualmente para os oceanos	36

Nota: Organismos terrestres, do solo e dos oceanos contém cerca de $5,2 \times 10^{15}$ g e 95×10^{15} g e $6,5 \times 10^{15}$ g, respectivamente, de nitrogênio orgânico que é ativo no ciclo. Admitindo que a quantidade de N_2 na atmosfera permanece constante (entrada=saida), o tempo médio de residência (o tempo médio que a molécula de nitrogênio permanece na forma orgânica) é cerca de 370 anos [(tamanho do pool)/(fixação input)=($5,210^{15}$ g + 95×10^{15} g)/(80×10^{12} g ano⁻¹ + 19×10^{12} g ano⁻¹ + 170×10^{12} g ano⁻¹)] (Schlesinger, 1997). ^a N/C não-calculado.

- **Relâmpagos.** Os relâmpagos são responsáveis por aproximadamente 8% do nitrogênio fixado. Convertem o vapor de água e oxigênio em radicais hidroxilas livres altamente reativos, em átomos de hidrogênio livre e em átomos de oxigênio livre, que atacam o nitrogênio molecular (N_2) para formar o ácido nítrico (HNO_3). Posteriormente, esse ácido nítrico precipita sobre a Terra junto com a chuva.
- **Reações fotoquímicas.** Cerca de 2% do nitrogênio fixado é derivado de reações fotoquímicas entre o óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O_3), produzindo o ácido nítrico (HNO_3).
- **Fixação biológica do nitrogênio.** Noventa por cento (90%) do nitrogênio restante resultam da fixação biológica, nos quais as bactérias ou algas azuis (cianobactérias) fixam o N_2 em amônio (NH_4^+).

Do ponto de vista agrícola, a fixação biológica do nitrogênio é crítica, pois, raramente, a produção industrial de fertilizantes à base de nitrogênio supre a demanda agrícola (FAOSTAT, 2001).

Uma vez fixado em amônio ou nitrato, o nitrogênio entra no ciclo biogeoquímico, passando por várias formas orgânica ou inorgânicas antes de eventualmente retornar à forma de nitrogênio molecular (Figura 12.1; Tabela 12.1). Os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) gerados pela fixação ou liberados por decomposição da matéria orgânica do solo, tornam-se objetos de intensa competição entre plantas e microrganismos. Para per-

manecerem competitivos, os vegetais desenvolveram mecanismos para capturar esses íons, a partir da solução do solo, tão rápido quanto possível (ver Capítulo 5). Sob as concentrações elevadas no solo, que ocorrem após a fertilização, a absorção do amônio e do nitrato pelas raízes pode exceder a capacidade de uma planta em assimilar esses íons, levando ao seu acúmulo nos tecidos vegetais.

O amônio ou o nitrato armazenados podem ser tóxicos

As plantas podem acumular altos níveis de nitrato ou podem translocá-lo através dos tecidos sem efeitos prejudiciais. Entretanto, se os animais e os homens consumirem material vegetal com altos níveis de nitrato, eles podem sofrer de metemoglobinemia, uma doença na qual o fígado reduz o nitrato a nitrito, o que se combina com a hemoglobina, resultando em uma hemoglobina incapaz de se combinar com o oxigênio. O homem e os outros animais são capazes também de converter nitrato em nitrosaminas, as quais são potentes carcinogênicos. Nesse sentido, alguns países impõem limites nos níveis de nitrato nos vegetais que são consumidos pelo homem.

Em comparação com o nitrato, altos níveis de amônio são tóxicos tanto para as plantas quanto para os animais. O amônio é capaz de dissipar os gradientes de prótons transmembrana (Figura 12.2) necessários ao transporte de elétrons na fotossíntese e na respiração (ver Capítulos 7 e 11), assim como para a

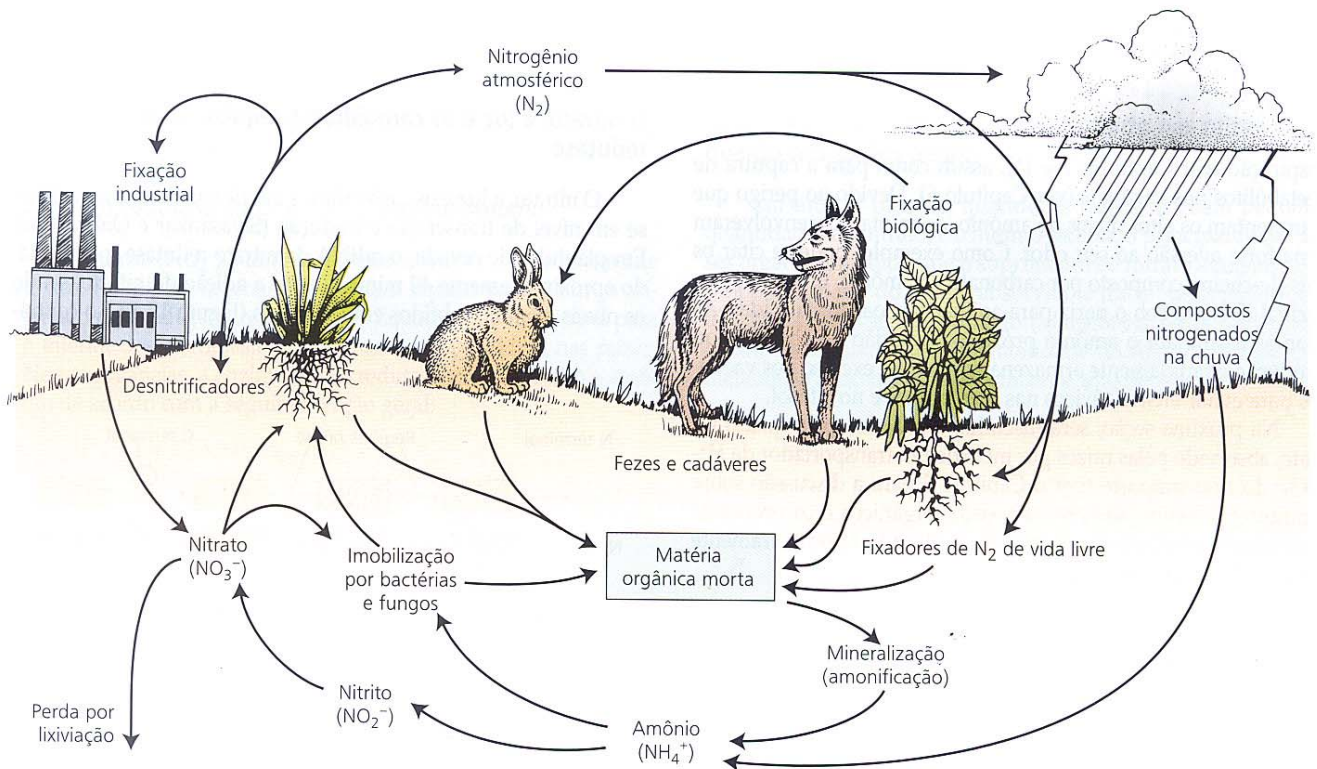


FIGURA 12.1 Ciclo do nitrogênio. O nitrogênio da atmosfera varia desde a forma gasosa à de íons reduzidos, antes de ser incorporado a compostos orgânicos nos organismos vivos. Algumas etapas envolvidas no ciclo do nitrogênio estão representadas.

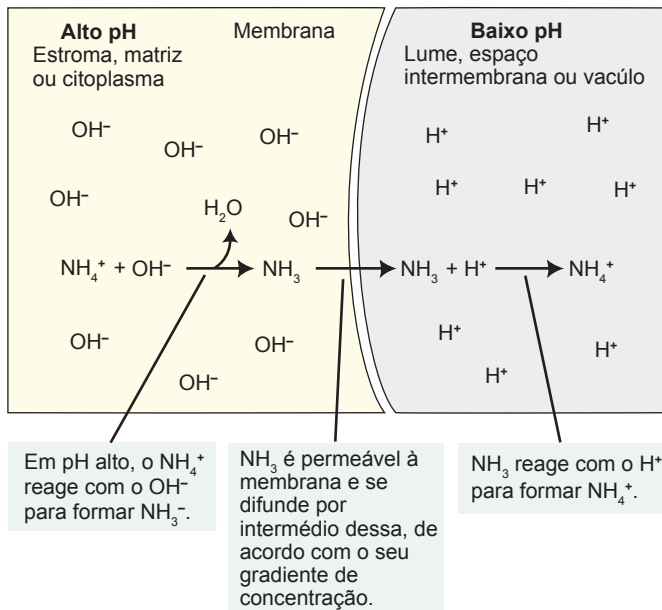


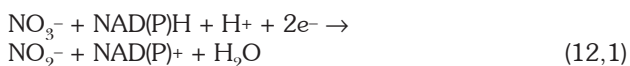
FIGURA 12.2 A toxicidade do NH_4^+ pode dissipar os gradientes de pH. O lado esquerdo representa o estroma, a matriz mitocondrial ou o citoplasma, onde o pH é mais elevado. O lado direito representa o lume, o espaço intermembrana ou o vacúolo, onde o pH é mais baixo; a membrana representa o tilacóide do cloroplasto, a membrana interna mitocondrial ou o tonoplasto do vacúolo de uma célula de raiz. O resultado líquido da reação mostra que as concentrações de OH^- do lado esquerdo e de H^+ do lado direito diminuíram, isto é, o gradiente de pH foi dissipado (segundo Bloom, 1997).

captura de metabólitos nos vacúolos (ver Capítulo 6). Devido ao perigo que representam os altos níveis de amônio, os animais desenvolveram uma forte aversão ao seu odor. Como exemplo, pode-se citar os sais-de-cheiro, composto por carbonato de amônio, um vapor medicinal liberado sob o nariz para animar pessoas desfalecidas. As plantas assimilam o amônio próximo da região de absorção ou produção e rapidamente armazenam qualquer excesso nos vacúolos para evitar efeitos tóxicos nas membranas e no citosol.

Na próxima seção, será discutido o processo pelo qual o nitrato, absorvido pelas raízes por meio de um transportador de H^+ - NO_3^- do tipo simporte (ver o Capítulo 6 para a discussão sobre simprote), é assimilado em compostos orgânicos e os processos enzimáticos responsáveis pela redução do nitrato primeiramente em nitrito e depois em amônio.

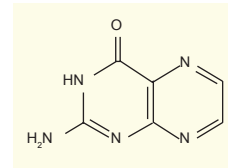
ASSIMILAÇÃO DO NITRATO

As plantas assimilam a maioria do nitrato absorvido por suas raízes em compostos orgânicos nitrogenados. A primeira etapa do processo é a redução do nitrato em nitrito no citoplasma (Oaks, 1994). A enzima nitrato redutase catalisa esta reação:



Onde NAD(P)H indica NADH ou NADPH. A forma mais comum da enzima nitrato redutase utiliza somente o NADH como doador de elétrons; outra forma da enzima, encontrada predominantemente em tecidos não-clorofilados, como raízes, pode usar tanto o NADH quanto o NADPH (Warner e Kleinhofs, 1992).

As nitrato redases das plantas superiores são formadas por duas subunidades idênticas com três grupos prostéticos cada: FAD (flavina andenina dinucleotídeo), heme e um complexo formado entre o molibdênio e uma molécula orgânica denominada *pterina* (Mendel e Stallmeyer, 1995; Campbell, 1999).



Uma pterina (completamente oxidada)

Nitrato redutase é a principal proteína contendo molibdênio encontrada nos tecidos vegetativos e um dos sintomas da deficiência do molibdênio é o acúmulo de nitrato, devido à diminuição da atividade da nitrato redutase.

A comparação entre as seqüências de aminoácidos da nitrato redutase de diversas espécies com aquelas de outras proteínas já caracterizadas que se ligam ao FAD, heme ou ao molibdênio, resultou em um modelo para a nitrato redutase com três domínios apresentados na Figuar 12.3. O domínio de ligação do FAD aceita dois elétrons do NADH ou do NADPH. Os elétrons são deslocados pelo domínio heme para o complexo molibdênio, onde são transferidos para o nitrato.

O nitrato, a luz e os carboidratos regulam a nitrato redutase

O nitrato, a luz e os carboidratos interferem na nitrato redutase em nível de transcrição e tradução (Sivasankar e Oaks, 1996). Em plântulas de cevada, o mRNA da nitrato redutase foi detectado aproximadamente 40 minutos após a adição do nitrato, sendo os níveis máximos obtidos em três horas (Figura 12.4). Ao contrário

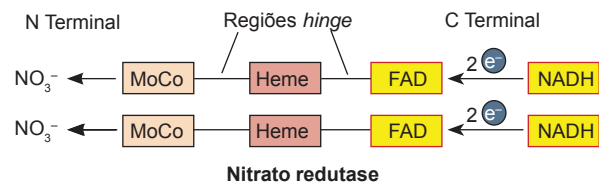
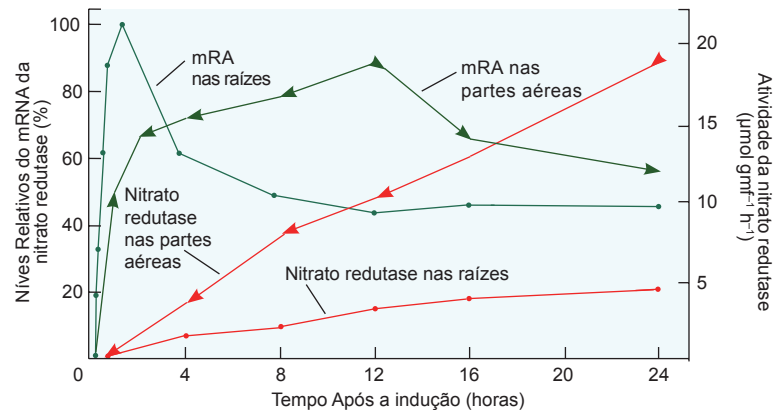


FIGURA 12.3 Modelo do dímero da nitrato redutase indicando os três domínios de ligação, dos quais as seqüências de polipeptídeos são similares nos eucariontes: complexo molibdênio (CoMo), grupo heme e FAD; O NADH liga-se ao domínio de ligação do FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C), através de cada elemento de transferência de elétrons, até o grupo amino terminal (N). O nitrato é reduzido no complexo molibdênio próximo à região amino terminal. As seqüências dos polipeptídeos nas regiões *hinge* são altamente variáveis entrea as espécies.

FIGURA 12.4 O aumento da atividade da nitrato redutase resulta da indução da síntese do mRNA da enzima em partes aéreas e raízes de cevada; gmf, grama de massa fresca (Kleinhofs e cols., 1989).



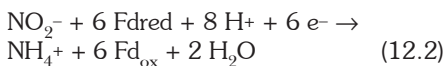
do rápido acúmulo do do mRNA, houve um incremento gradual linear na atividade da nitrato redutase, refletindo a síntese mais lenta da proteína.

Além disso, a proteína sofre também uma modulação pós-tradução (envolvendo um fosforilação reversível) análoga à regulação da sacarose fosfato sintase (ver Capítulos 8 e 10). A luz e os níveis de carboidratos, além de outros fatores ambientais, estimulam a proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos de serina na proteína nitrato redutase, promovendo a ativação da enzima.

Agindo na direção inversa, o escuro e o Mg^{2+} estimulam a proteína quinase, a qual fosforila os mesmos resíduos de serina, interagindo com a proteína inibidora 14-3-3 e inativando a nitrato redutase (Kaiser e cols., 1999). A regulação da atividade da nitrato redutase através da fosforilação e da desfosforilação possibilita um controle mais rápido do que o obtido através da síntese ou degradação da enzima (minutos versus horas).

A nitrato redutase converte o nitrito em amônio

O nitrito (NO_2^-) é um íon altamente reativo e potencialmente tóxico. As células vegetais transportam rapidamente o nitrito originado pela redução do nitrato (ver Equação 12.1) do citosol para o interior dos cloroplastos nas folhas e nos plastídeos nas raízes. Nessas organelas, a enzima nitrito redutase reduz o nitrito a amônio de acordo com a seguinte reação geral:



Onde o Fd representa a ferredoxina e os símbolos subscritos *red* e *ox*, forma reduzida e oxidada, respectivamente. A ferredoxina reduzida deriva do transporte de elétrons da fotossíntese nos cloroplastos (ver Capítulo 7) e do NADPH gerado pela via da oxidação da pentose fosfato nos tecidos não-clorofilados (ver Capítulo 11).

Tanto os cloroplastos quanto os plastídeos das raízes possuem diferentes formas da enzima, contudo ambas as formas con-

system de um único polipeptídeo com dois grupos prostéticos: um grupo ferro-enxofre, Fe_4S_4 , e um grupo heme especializado (Siegel e Wilkerson, 1989). Tais grupos agem conjuntamente ligando-se ao nitrito e o reduzindo-o diretamente a amônio, sem acular compostos nitrogenados em estado redox intermediários. O fluxo de elétrons pela ferredoxina, Fe_4S_4 , e heme podem ser representados, conforme a Figura 12.5.

A nitrito redutase é codificada no núcleo e sintetizada no citoplasma, apresentando um peptídeo de trânsito N-terminal que direciona o seu deslocamento para os plastídeos (Wray, 1993). Enquanto o NO_3^- e a luz induzem a transcrição do mRNA da nitrito redutase, os produtos finais do processo — asparagina e glutamina — reprimem essa indução.

As plantas podem assimilar nitrato tanto nas raízes quanto nas partes aéreas

Em muitas plantas, quando as raízes recebem pequenas quantidade de nitrato, é o mesmo reduzido principalmente nesses órgãos. À medida que o suprimento de nitrato aumenta, uma proporção maior do nitrato absorvido é translocado para as partes aéreas onde será assimilado (Marschner, 1995). Mesmo sob condições similares de disponibilidade do nitrato, o balanço do metabolismo do nitrato entre raízes e a parte aérea — conforme

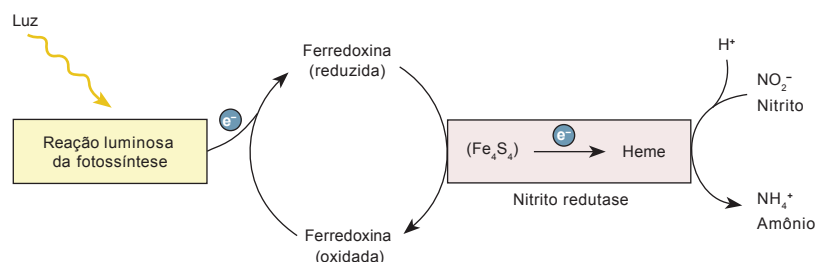


FIGURA 12.5 Modelo do acoplamento do fluxo de elétrons da fotossíntese, via ferredoxina, com a redução do nitrito pela nitrito redutase. A enzima nitrito redutase possui dois grupos prostéticos, Fe_4S_4 e heme, os quais participam na redução do nitrito a amônio.

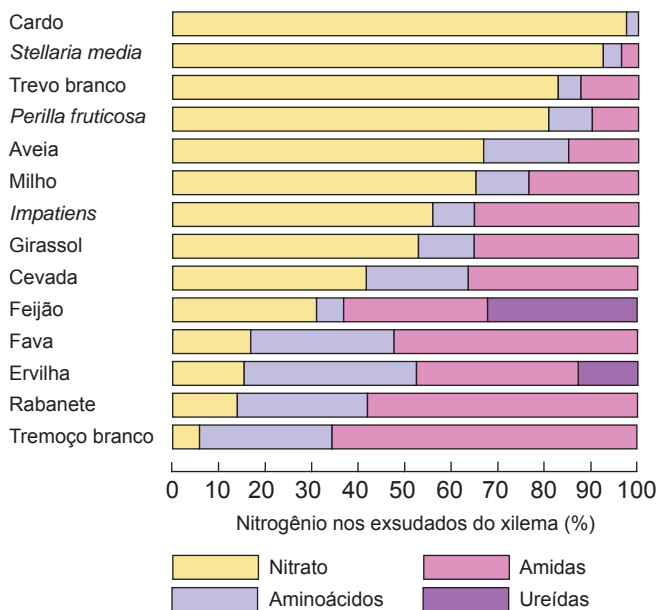


FIGURA 12.6 Quantidade relativa de nitrato e outros compostos nitrogenados do exsudado do xilema de várias espécies vegetais. As plantas foram cultivadas com as suas raízes expostas a soluções de nitrato e a seiva do xilema foi coletada por rompimento do caule. Observe a presença de ureidas, compostos nitrogenados especializados, em feijão e ervilha (que será discutido posteriormente no texto) (Pate, 1983).

indicado pela proporção da atividade da nitrato redutase em cada um dos dois órgãos ou pelas concentrações relativas do nitrato e do nitrogênio reduzido na seiva do xilema — varia de espécie para espécie.

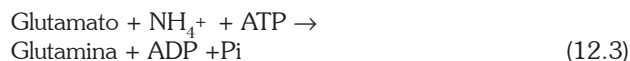
Nas plantas como o cardo (*Xanthium strumarium*), o metabolismo dos nitratos é restrito às partes aéreas; em outras plantas, como o tremoço branco (*Lupinus albus*), a maior parte do nitrato é metabolizado nas raízes (Figura 12.6); Em geral, as espécies nativas de regiões de clima temperado dependem mais intensamente da assimilação do nitrato pelas raízes do que as espécies das regiões tropicais e subtropicais.

ASSIMILAÇÃO DO AMÔNIO

As células vegetais evitam a toxicidade do amônio pela rápida conversão do amônio gerado a partir da assimilação do nitrato ou da fotorrespiração (ver Capítulo 8) em aminoácidos. A principal via para esta conversão envolve a ação seqüencial da glutamina sintetase e da glutamato sintase (Lea e cols., 1992). Nesta seção serão discutidos os processos enzimáticos responsáveis pela assimilação do amônio em aminoácidos essenciais, além do papel das amidas na regulação do metabolismo do nitrogênio e do carbono.

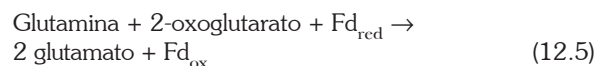
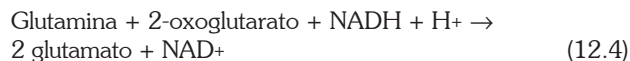
A conversão do amônio em aminoácidos requer duas enzimas

A glutamina sintetase (GS) combina o amônio com o glutamato para formar a glutamina (Figura 12.7A):



Esta reação necessita a hidrólise de uma molécula de ATP e envolve um cátion bivalente, como o Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+} como co-fator. As plantas possuem duas classe de GS, uma no citosol e a outra nos plastídeos das raízes ou nos cloroplastos das partes aéreas. As formas citosólicas são expressas durante a germinação de sementes ou no feixe vascular das raízes e partes aéreas, produzindo glutamina para o transporte do nitrogênio intracelular. A GS nos plastídeos das raízes forma o nitrogênio amida que é consumido localmente, enquanto que a GS dos cloroplastos das partes aéreas reassimila o NH_4^+ da fotorrespiração (Lam e cols., 1996). Tanto os níveis de carboidratos quanto os de luz alteram a expressão das formas dessa enzima presentes nos plastídeos, mas apresentam pouco efeito nas formas citosólicas.

Os níveis elevados de glutamina nos plastídeos estimulam a atividade da glutamato sintase (conhecido como *glutaminas: 2-oxoglutarato aminotransferase*, ou GOGAT). Essa enzima transfere o grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato (ver Figura 12.7A). As plantas possuem dois tipos de GOGAT: um recebe elétrons do NADH, e o outro elétrons da ferredoxina (Fd):



A enzima do tipo NADH (NADH-GOGAT) está localizada nos plastídeos de tecidos não-fotossintéticos como raízes ou feixes vasculares de folhas em desenvolvimento. Nas raízes a NADH-GOGAT está envolvida na assimilação do NH_4^+ absorvido da rizosfera (porção do solo localizado próximo a superfície das raízes), enquanto que, nos feixes vasculares de folhas em desenvolvimento, a NADH-GOGAT assimila a glutamina translocada das raízes ou das folhas senescentes.

A glutamato sintase do tipo ferredoxina-dependente (Fd-GOGAT) é encontrada nos cloroplastos e age no metabolismo fotorrespiratório do nitrogênio. Tanto a quantidade da proteína quanto a sua atividade aumentam com os níveis de luz. As raízes, em particular naquelas sob nutrição com nitrato, têm Fd-GOGAT nos plastídeos. Provavelmente, a finalidade da Fd-GOGAT das raízes seja incorporar a glutamina gerada durante a assimilação do nitrato.

O amônio pode ser assimilado através de uma rota alternativa

A glutamato desidrogenase (GDH) catalisa uma reação reversível que sintetiza ou desamina o glutamato (Figura 12.7B):



Uma forma NADH-dependente do GDH é encontrada nas mitocôndrias e uma forma NADPH-dependente ocorre nos cloroplastos de órgãos fotossintéticos. Embora ambas as formas sejam relativamente abundantes, elas não podem substituir a rota da GS-GOGAT para a assimilação do amônio, tendo como função principal desaminar o glutamato (ver figura 12.7B).

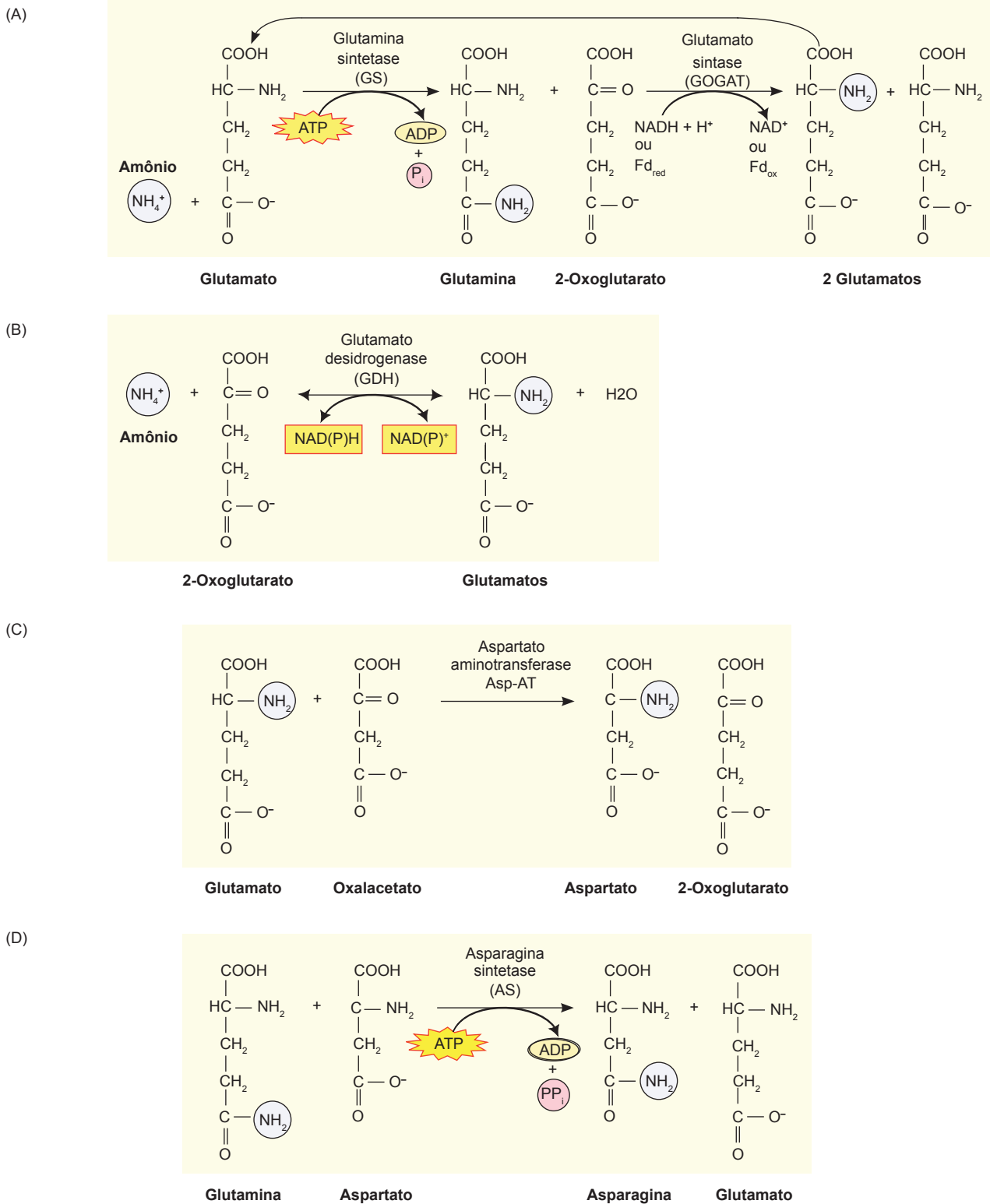
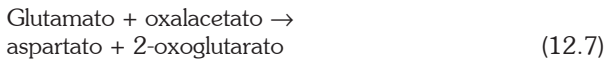


Figura 12.7 Estrutura e rotas de síntese de compostos envolvidos no metabolismo do amônio. O amônio pode ser assimilado por um dos vários processos. (A) A rota da GS-GOGAT que forma a glutamina e glutamato. É necessário um co-fator reduzido para a reação: ferredoxina nas folhas verdes e o NADH nos tecidos não-fotossintéticos. (B) A rota do GDH que forma o glutamato, utilizando o NADH ou o NADPH como um reagente redutor. (C) Transferência do grupo amino do glutamato para o oxalacetato para formar o aspartato (catalisado pela enzima aspartato aminotransferase). (D) Síntese da asparagina pela transferência de um grupo aminoácido da glutamina para o aspartato (catalisada pela enzima asparagina sintetase).

As reações de transaminação transferem o nitrogênio

Uma vez assimilado em glutamina e glutamato, o nitrogênio é incorporado em outros aminoácidos por meio de reações de transaminação. As enzimas que catalisam tais reações são conhecidas como aminotransferases. Um exemplo é o aspartato aminotransferase (Asp-AT), que catalisa a seguinte reação (Figura 12.7C):



no qual o grupo amino do glutamato é transferido para o átomo carboxil do aspartato. O aspartato é um aminoácido que participa do transporte malato-aspartato, no processo de transferência de equivalentes redutores das mitocôndrias e cloroplastos para o citosol (ver Capítulo 11) e no transporte do carbono a partir das células do mesófilo até a bainha do feixe vascular no processo de fixação C4 do carbono (ver Capítulo 8). Todas as reações de transaminação requerem o piridoxal fosfato (vitamina B₆) como co-fator.

As aminotransferases são encontradas no citoplasma, nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos glioxissomos e nos peroxissomos. As aminotransferases localizadas nos cloroplastos podem desempenhar um importante papel na biossíntese dos aminoácidos, pois folhas ou cloroplastos isolados expostos ao dióxido de carbono marcado radiotivamente, incorporam com rapidez a marca em glutamato, aspartato, alanina, serina e glicina.

A asparagina e a glutamina unem o metabolismo do carbono e do nitrogênio

A asparagina, isolada pela primeira vez do aspargo em 1806, foi a primeira amida a ser identificada (Lam e cols. 1996). Esse aminoácido não atua apenas como um precursor de proteína, mas como um elemento-chave no transporte e no armazenamento do nitrogênio, devido à sua estabilidade é a alta razão nitrogênio:carbono (2N para 4C da asparagina, contra 2N para 5C da glutamina e 1N para 5C do glutamato).

A principal rota para a síntese da asparagina envolve a transferência do nitrogênio amida da glutamina para a asparagina (Figura 12.7D):



A asparagina sintetase (AS), a enzima que catalisa esta reação, é encontrada no citosol das células das folhas e raízes e nos nódulos que fixam o nitrogênio (ver a próxima seção). Em raízes de milho, , sobretudo aquelas sob níveis potencialmente tóxicos de amônia, o amônio pode substituir a glutamina como fonte do grupo amina (Sivankar e Oaks, 1996).

Altos níveis de luz e carboidratos – condições que estimulam a GS e a Fd-GOGAT dos plastídeos – inibem a expressão dos genes que codificam AS e a atividade da enzima. A regulação antagônica dessas rotas competitivas auxilia no balanço do metabolismo do carbono e do nitrogênio nos vegetais (Lam e cols., 1996). As condições de ampla energia (i. é, com altos níveis de luz e de carboidratos) estimulam a GS e a GOGAT, inibem a AS e assim favorecem a assimilação do nitrogênio em glutamina e em glutamato, compostos ricos em carbono e que participam na síntese de novos compostos nos vegetais.

Por comparação, em condições limitadas de energia ocorre a inibição da GS e da GOGAT e a estimulação da AS, resultando na

assimilação favorável do nitrogênio em asparagina, um composto rico em nitrogênio e suficientemente estável para ser transportado em longas distâncias e armazenado por muito tempo.

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

A fixação biológica representa a forma mais importante de fixar o nitrogênio atmosférico N₂ em amônio, representando, assim, o ponto-chave do ingresso do nitrogênio molecular no ciclo biogeoquímico do nitrogênio (ver Figura 12.1). Nesta seção, serão abordadas as propriedades das enzimas nitrogenases, responsáveis pela fixação do nitrogênio, as reações simbiotes entre organismos fixadores do nitrogênio e plantas superiores, a formação de estruturas especializadas nas raízes infectadas por bactérias fixadoras de nitrogênio pelos procariontes simbiotes e seus hospedeiros.

Bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre e simbiotes

Conforme já mencionado, certas bactérias podem converter o nitrogênio atmosférico em amônio (Tabela 12.2). A maior parte desses organismos procariontes fixadores de nitrogênio tem vida livre no solo. Poucos formam associações simbiotes com plantas superiores, nas quais o procarionte fornece diretamente à planta hospedeira o nitrogênio fixado em troca de outros nutrientes e carboidratos (Tabela 12.2). Tais simbioses ocorrem nos nódulos formados nas raízes dos vegetais contendo bactérias fixadoras.

O tipo mais comum de simbiose ocorre entre as espécies da família *Leguminosae* e as bactérias de solo dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (coletivamente chamados **rizóbios**; Tabela 12.3 e Figura 12.8). Outro tipo comum de simbiose ocorre entre várias espécies de plantas lenhosas, como árvores do gênero *Alnus*, e bactérias do solo do gênero *Frankia*. Podem ser encontrados, ainda, outros tipos de associações entre herbáceas da América do Sul do gênero *Gunnera* e pteridófitas do gênero *Azolla*, as quais formam associações com cianobactérias *Nostoc* e *Anabaena*, respectivamente (ver Tabela 12.2 e Figura 12.9).

A fixação do nitrogênio requer condições anaeróbicas

Em decorrência da irreversível inativação que o oxigênio provoca na enzima nitrogenase, envolvida na fixação do nitrogênio, este deve ser fixado sob condições anaeróbicas. Assim, cada organismo fixador de nitrogênio listado na Tabela 12.2 funciona em condições naturais de ausência de oxigênio ou desenvolve condições internas de anaerobiose, mesmo na presença do oxigênio.

Nas cianobactérias, as condições de anaerobiose são criadas em células especializadas denominadas heterocistos (ver Figura 12.9). Os heterocistos são células com paredes espessadas, que se diferenciam quando as cianobactérias filamentosas são privadas do NH₄⁺. Tais células não apresentam o fotossistema II, o qual produz o oxigênio nos cloroplastos (ver Capítulo 7); assim, elas não produzem oxigênio (Burris, 1976). Os heterocistos parecem representar uma adaptação para que ocorra a fixação do nitrogênio, sendo largamente encontrados entre as cianobactérias aeróbicas fixadoras do nitrogênio.

TABELA 12.2
Exemplos de organismos que podem realizar a fixação do nitrogênio

Fixação simbiote do nitrogênio	
Planta hospedeira	Fixação simbiote de N
Legumes: leguminosas e <i>Parasponia</i>	<i>Azorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Photorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i>
Actinorrízicas: <i>Alnus</i> (árvore), <i>Ceanothus</i> (arbusto), <i>Casuarina</i> (árvore), <i>Datisca</i> (arbusto)	<i>Frankia</i>
<i>Gunnera</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Azolla</i> (pteridófita aquática)	<i>Anabaena</i>
<i>Cana-de-açúcar</i>	<i>Acetobacter</i>
Fixadores de nitrogênio de vida livre	
Tipo	Gêneros fixadores de N
Cianobactérias (algas azuis-esverdeadas)	<i>Anabaena</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Nostoc</i>
Outras bactérias	
Aeróbicas	<i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Derrxia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i>
Facultativas	<i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i>
Anaeróbicas	
Não-tossintetizantes	<i>Clostridium</i> , <i>Methanococcus</i> (Archaeobacteria)
Fotossintetizantes	<i>Chromatium</i> , <i>Rhodospirillum</i>

As cianobactérias podem fixar o nitrogênio em condições de anaerobiose, como aquelas encontradas em campos alagados. Nos países asiáticos, ambos os tipos de cianobactérias fixadoras do nitrogênio, com ou sem os heterocistos, representam o principal modo de manutenção de um suprimento adequado de nitrogênio no solo das plantações de arroz. Esses microrganismos fixam o nitrogênio quando os campos estão alagados e morrem quando secam, liberando o nitrogênio fixado para o solo. Uma outra fonte importante de nitrogênio em campos alagados cultivados com ar-

roz é a pteridófita aquática *Azolla*, a qual se associa com a cianobactéria *Anabaena*. A associação *Azolla-Anabaena* pode fixar 0,5 Kg de nitrogênio atmosférico por hectare/dia, uma taxa de fertilização suficiente para manter uma lavoura de arroz.

As bactérias de vida livre, capazes de fixar nitrogênio, podem ser aeróbicas, facultativas ou anaeróbicas (ver Tabela 12.2)

- Bactérias aeróbicas fixadoras de nitrogênio, como a *Azotobacter*, mantêm condições reduzidas de oxigênio (condições

TABELA 12.3
Associações entre plantas hospedeiras e rizóbios

Planta hospedeira	Rizóbios simbiotes
<i>Parasponia</i> (não-leguminosa, antigamente chamada de <i>Trema</i>)	<i>Bradyrhizobium</i> spp.
Soja (<i>Glycine max</i>)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (tipo com crescimento lento) <i>Sinorhizobium fredii</i> (tipo com crescimento rápido)
Alfafa (<i>Medicago sativa</i>)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Sesbania</i> (aquática)	<i>Azorhizobium</i> (forma nódulos nas raízes e no caule; no caule se desenvolvem raízes adventícias)
Feijão (<i>Phaseolus</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>Rhizobium tropici</i> , <i>Rhizobium etli</i>
Trevo (<i>Trifolium</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
<i>Aeschenomene</i> (aquática)	<i>Photorhizobium</i> (rizóbios fotossinteticamente ativos, que formam nódulos no caule, provavelmente associados a raízes adventícias)

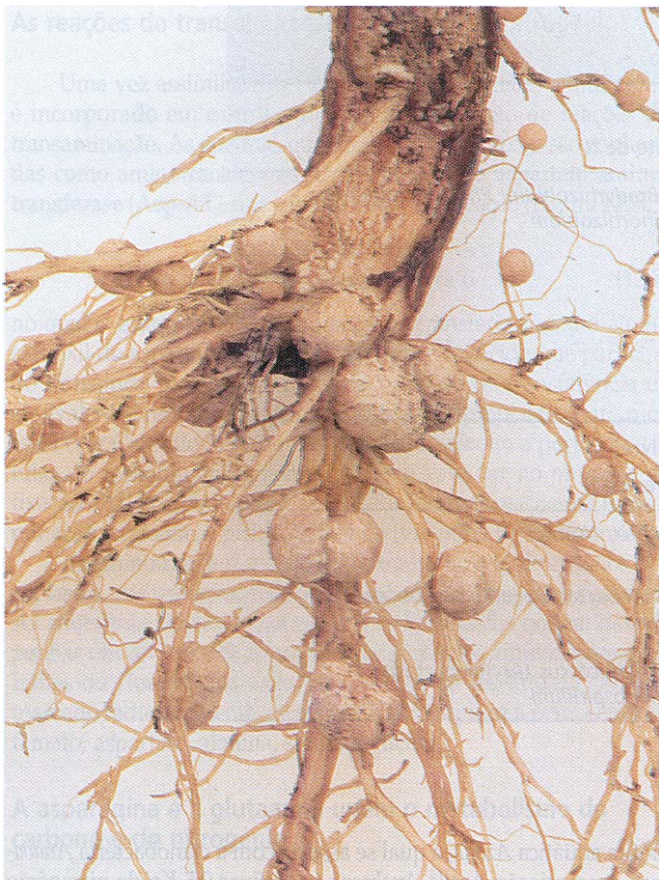


FIGURA 12.8 Nódulos em raiz em soja. Os nódulos são o resultado da infecção por *Rhizobium japonicum* (© Wally Eberhart/Visuals Unlimited).

microaeróbicas) por meio das suas altas taxas de respiração (Burris, 1976). Outras, como a *Gloeotheca*, liberam o O₂ fotossintético durante o dia e fixam o nitrogênio durante a noite.

- Organismos *facultativos* capazes de crescer sob condições aeróbicas e anaeróbicas, geralmente fixando o nitrogênio somente sob condições anaeróbicas.
- Para as bactérias *anaeróbicas* fixadoras de nitrogênio, o oxigênio não representa um problema, pois está ausente no ambiente. Tais organismos podem ser tanto fotossintetizantes (como *Rhodospirillum*) quanto não-fotossintetizantes (como *Clostridium*).

A fixação simbiote do nitrogênio ocorre em estruturas especializadas

Os organismos procariontes simbiotes fixadores de nitrogênio ocorrem no interior de nódulos, órgãos especiais da planta hospedeira que contêm as bactérias fixadoras (ver Figura 12.8). No caso do gênero *Gunnera*, esses órgãos ocorrem em glândulas do caule, que se desenvolvem independentemente do organismo simbiote. No caso das leguminosas e das plantas actinorrízicas, as bactérias fixadoras de nitrogênio induzem a formação de nódulos nas raízes.

As gramíneas também podem desenvolver relações simbiotes com organismos fixadores de nitrogênio, mas nessas associações os nódulos não são produzidos. No caso, a bactéria fixadora de nitrogênio coloniza os tecidos do vegetal ou se ancora na superfície da raiz, principalmente próximas da zona de alongamento e dos pêlos radiculares (ver Glossário) (Reis e cols., 2000). Por exemplo, a bactéria fixadora de nitrogênio *Acetobacter diazotrophicus* vive no apoplasto dos tecidos do caule de cana-de-açúcar e pode suprir o seu hospedeiro com nitrogênio suficiente para garantir a sua independência de fertilizantes nitrogenados. (Dong e cols., 1994). O potencial para aplicação de *Azospirillum* em milho e em outros grãos tem sido explorado, porém esse organismo parece fixar pouco nitrogênio quando associado a plantas (Vande Broek e Vanderleyden, 1995).

As plantas leguminosas e actinorrízicas regulam a permeabilidade dos gases nos seus nódulos, mantendo ali um nível de oxigênio que pode sustentar a respiração, mas é suficientemente baixo para evitar a inativação da nitrogenase (Kuzma e cols., 1993). A permeabilidade gasosa aumenta na luz e decresce sob condições de seca ou exposição ao nitrato. O mecanismo de regulação da permeabilidade gasosa ainda não é conhecido.

Os nódulos possuem uma heme proteína que se liga ao oxigênio chamada de **leg-hemoglobina**, a qual está presente em altas concentrações (700 μM nos nódulos de soja) no citoplasma das células infectadas do nódulo, conferindo a esses nódulos uma cor rosada. A planta hospedeira produz a porção globina da leg-hemoglobina em resposta à infecção pela bactéria (Marschner, 1995); a bactéria simbiote produz a porção heme. A leg-hemoglobina apresenta uma alta afinidade pelo oxigênio (K_m de aproximadamente 0,01 μM), cerca de 10 vezes mais alta do que a cadeia β da hemoglobina humana.

Embora se acreditasse que a leg-hemoglobina agisse como um tampão para o oxigênio do nódulo, estudos recentes indicam que ela armazena uma quantidade suficiente de oxigênio para a manutenção da respiração nodular por poucos segundos (Denison e Harter, 1995). Sua função é auxiliar o transporte do oxigênio para a respiração das células bacterianas simbióticas, de maneira análoga ao transporte de oxigênio realizado pela hemoglobina nos tecidos dos animais (Ludwig e de Vries, 1986).

O estabelecimento da simbiose requer uma troca de sinais

A simbiose entre as leguminosas e os rizóbios não é obrigatória. As plântulas de leguminosas desenvolvem-se sem qualquer associação com rizóbios e podem permanecer em tal condição durante todo seu ciclo de vida. Os rizóbios também ocorrem como organismos de vida livre no solo. Entretanto, sob condições limitantes de nitrogênio, os simbiotes procuram uns aos outros, por meio de uma elaborada troca de sinais. A sinalização, o processo de infecção e o desenvolvimento de nódulos fixadores de nitrogênio envolvem genes específicos tanto da planta hospedeira quanto dos simbiotes.

Os genes vegetais específicos de nódulos são denominados genes **nodulinos** (*Nod*), enquanto que os genes dos rizóbios participantes da formação dos nódulos são chamados de genes de **nodulação** (*nod*) (Heidstra e Bisseling, 1996). Os genes *nod* são classificados de *nod* gerais e genes *nod* hospedeiro-específico. Os genes *nod* gerais – *nodA*, *nodB* e *nodC* – são encontrados em todas as cepas de rizóbios, enquanto os genes *nod* hospedeiro-es-

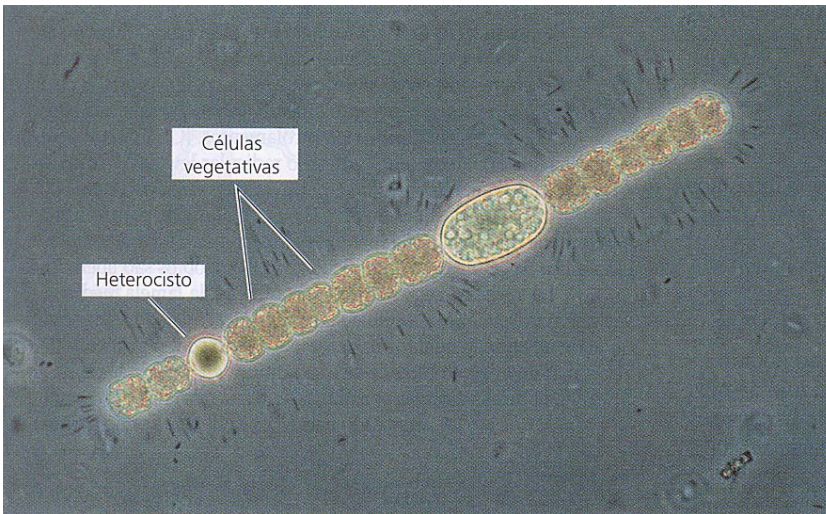


FIGURA 12.9 Um filamento de cianobactéria fixadora de nitrogênio (*Anabaena*) com um heterocisto. O heterocisto com paredes espessas, intercalado entre as células vegetativas, possui um ambiente interno anaeróbico que permite à cianobactéria fixar nitrogênio em condições aeróbicas (©Paul W. Johnson/Biological Photo Service)

pecífico – Como *nodP*, *nodQ* e *nodH*, ou os *nodF*, *nodE* e *nodL* –, diferem entre as espécies de rizóbios e determinam o tipo de hospedeiros. Somente um dos genes *nod*, o gene regulador *nodD*, é constitutivamente expresso e, como será explicado em detalhe, o seu produto proteico (*NodD*) regula a transcrição de outros genes *nod*.

O primeiro estágio no estabelecimento da relação simbiótica entre a bactéria fixadora de nitrogênio e seu hospedeiro é a migração da bactéria em direção as raízes da planta hospedeira. Esta migração é uma resposta quimiotática, mediada por atrativos químicos, em especial (isso)flavonóides e betaínas, secretados pelas raízes. Tais atrativos ativam a proteína do rizóbio NodD, a qual induz a transcrição de outros genes *nod* (Phillips e Kapulnik, 1995). A região promotora de todos os operons *nod*, exceto a do *nodD*, possui seqüências altamente conservadas chamadas de *nod box*. A ligação da NodD ao *nod box* induz a transcrição de outros genes *nod*.

Os fatores Nod produzidos pela bactéria atuam como sinalizadores para a simbiose

Os genes *nod* ativados pelo NodD codificam as proteínas de modulação, cuja maioria está envolvida na biossíntese dos **fatores Nod**, os quais são moléculas sinalizadoras oligossacarídeos de lipoquitina, que apresentam uma quitina β-1→4 ligada a um esqueleto *N*-acetil-D-glicosamina (variando em comprimento de três a seis unidades de açúcar), além de uma cadeia acil lipídica na posição C-2 do açúcar não-redutor (Figura 12.10).

Três dos genes *nod* (*nodD* e *nodC*) codificam as enzimas (NodA, NodB e NodC, respectivamente) necessárias à síntese dessa estrutura (Stokkermans e cols., 1995):

1. A NodA é uma *N*-aciltransferase que catalisa a adição da cadeia acil lipídica.
2. A NodB é uma desacetilase quitina-oligossacarídeo que remove o grupo acetil de um açúcar terminal não-redutor.
3. A NodC é uma sintase quitina-oligossacarídeo que liga os monômeros de *N*-acetil-D-glicosamina.

Os genes *nod* hospedeiro-específicos que variam entre as espécies de rizóbios estão envolvidos na modificação das cadeias acil lipídica ou na adição de grupos importantes na determinação da especificidade do hospedeiro (Carlson e cols., 1995):

- NodE e NodF determinam o comprimento e o grau de saturação da cadeia acil lipídica; aquelas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* e *R. meliloti* resultam na síntese de grupos acil lipídicos de 18:4 e 16:2, respectivamente (rever o Capítulo 11, onde o número que antecede os dois pontos indica o número total de carbonos na cadeia acil lipídica, enquanto o número posterior indica o número de ligações duplas).
- Outras enzimas, como NodL, influenciam a especificidade do hospedeiro aos fatores Nod pela adição de substituições específicas nas porções dos açúcares redutores e não redutores do esqueleto de quitina.

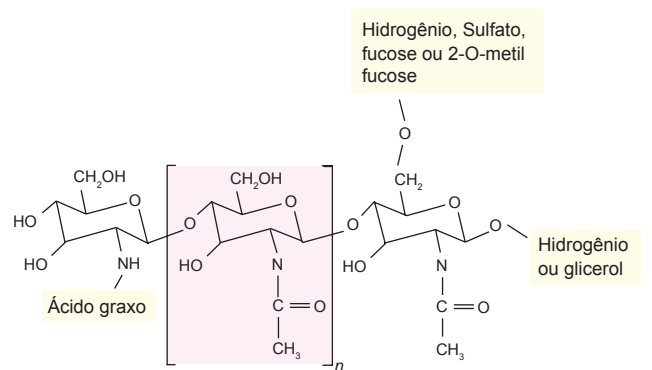


FIGURA 12.10 Os fatores Nod são oligossacarídeos de lipoquitina. A cadeia de ácido graxo apresenta normalmente de 16 a 18 carbonos. O número de sessões intermediárias repetidas (*n*) é geralmente dois a três (segundo Stokkermans e cols., 1995)

Uma elguminosa hospedeira em particular responde a um fator Nod específico. Os receptores da leguminosa para os fatores Nod parecem ser lectinas especiais (proteína de ligação a açúcar), produzidas nos pêlos radiculares (van Rhijn e cols., 1998; Etzler e cols., 1999). Os fatores Nod ativam estas lectinas, aumentando a hidrólise de ligações fosfoanidridrídica dos nucleosídeos de e trifosfato. Tal ativação da lectina direciona os rizóbios específicos aos hospedeiros apropriados e facilita a ligação dos rizóbios à parede celular do pêlo radicular.

A formação do nódulo envolve vários fitormônios

Os dois processos — infecção e organogênese do nódulo — ocorrem simultaneamente durante a formação do nódulo da raiz. Durante o processo de infecção, os rizóbios que estão ligados aos pêlos radiculares liberam os fatores *Nod*, que induzem um pronunciado e enrolamento das células do pêlo (Figura 12.11 A e B). Os rizóbios tornam-se envolvidos por um pequeno compartimento, formando pelo enrolamento. A parede celular do pêlo radicular também é degradada nessas regiões em resposta aos fatores *Nod*, permitindo que as células bacterianas acessem diretamente à superfície externa da membrana plasmática (Lazarowitz e Bisseling, 1997).

A próxima etapa é a formação de um **canal de infecção** (Figura 12.11 C), uma extensão interna tubular da membrana plasmática, que é produzida pela fusão de vesículas derivadas do Golgi no local da infecção. O canal cresce no seu ápice pela fusão de vesículas secretoras na extremidade do tubo. Na região mais profunda do córtex, próximo ao xilema, as células corticais desdiferenciam-se e iniciam a divisão, formando uma área distinta no córtex, denominada *primórdio nodular*, a partir do qual o nódulo irá se desenvolver. Os primórdios nodulares são formados opostos aos pólos do protoxilema do feixe vascular da raiz (Timmers e cols., 1999) (ver Tópico 12.1 na Internet).

Diferentes compostos de sinalização, atuando positiva ou negativamente, controlam a posição do primórdio nodular. O nucleosídeo uridina difunde-se do estelo para o córtex, na zona do protoxilema da raiz e estimula a divisão celular (Lazarowitz e Bisseling, 1997). O etileno é sintetizado na região do periciclo, difunde-se para o córtex e bloqueia a divisão celular no pólo oposto ao floema da raiz.

O canal de infecção, preenchido pelos rizóbios em proliferação, alonga-se através do pêlo radicular e das camadas de células corticais, em direção ao primórdio nodular. Quando o canal de infecção atinge as células especializadas no nódulo, sua extremidade funde-se com a membrana plasmática da célula hospedeira, liberando células bacterianas envoltas por uma membrana derivada da membrana plasmática da célula hospedeira (ver figura 12.11D). A ramificação do canal de infecção dentro dos nódulos permite a bactéria infectar muitas células (ver figura 12.11E e F) (Maylona e cols., 1995).

Inicialmente, as bactérias continuam a se dividir e a membrana que as envolve aumenta em superfície para acomodar esse crescimento pela fusão com vesículas menores. Logo após, a partir de um sinal da planta, as bactérias param de se dividir e começam a aumentar em tamanho e a se diferenciarem em organelas endossimbióticas fixadoras de nitrogênio denominadas bacterióides. A membrana que envolve os **bacterióides** é chamada de *membrana peribacterióide*.

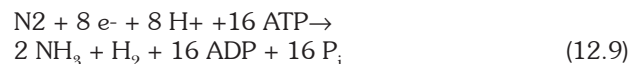
O nódulo como um todo desenvolve características semelhantes a um sistema vascular (o qual facilita a troca de nitrogênio

FIGURA 12.11 O processo de infecção durante a organogênese do nódulo. (A) Os rizóbios ligam-se a um pêlo radicular em formação, em resposta a atrativos químicos liberados pela planta. (B) Em resposta aos fatores produzidos pela bactéria, o pêlo radicular apresenta um enrolamento anormal e as células dos rizóbios crescem dentro dos enrolamentos. (C) A degradação localizada da parede celular do pêlo radicular leva à infecção e à formação do canal de infecção a partir das vesículas secretoras do Golgi das células da raiz. (D) O canal de infecção atinge a extremidade da célula e sua membrana funde-se com a membrana plasmática da célula do pêlo radicular. (E) Os rizóbios são liberados no apoplasto e penetram no complexo da lamela média da membrana plasmática da célula superepidermica, iniciando um novo canal de infecção, o qual forma um canal aberto com o primeiro. (F) O canal de infecção estende-se e se ramifica até atingir as células-alvo, onde as vesículas constituídas por membranas do vegetal, contendo bactérias, são liberadas no citosol.

fixado produzido pelos bacterióides por nutrientes disponibilizados pela planta) e uma camada de células para excluir o O_2 do interior do nódulo da raiz. Em algumas leguminosas de clima temperado (p. ex., ervilhas), os nódulos são alongados e cilíndricos, devido à presença de um *meristema nodular*. Os nódulos de leguminosas tropicais, como soja e amendoim, não apresentam um meristema persistente, além de serem esféricos (Rolfe e Gresshoff, 1988).

O complexo da enzima nitrogenase fixa o N_2

A fixação biológica do nitrogênio, semelhante à fixação industrial do nitrogênio, produz amônia a partir do nitrogênio molecular. A reação geral é:

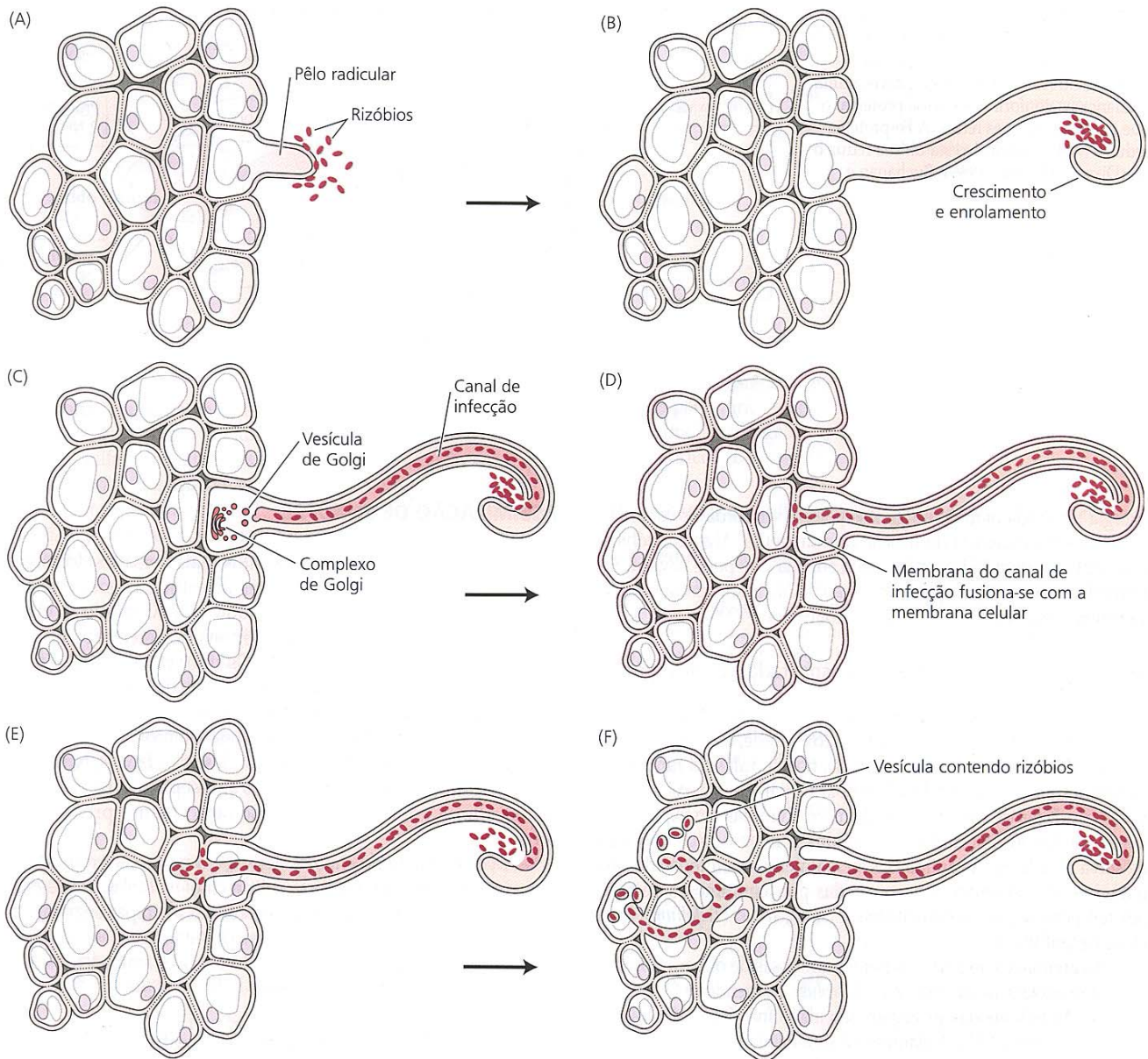


Observe que a redução do N_2 a $2NH_3$, uma transferência de seis elétrons, está associada à redução de dois prótons para formar H_2 . O complexo da enzima nitrogenase catalisa essa reação.

O complexo da enzima nitrogenase pode ser separado em dois componentes — a Fe-proteína e a MoFe-proteína —, nenhuma delas com atividade catalítica própria (Figura 12.12):

- A Fe-proteína é a menor dos dois componentes e apresenta duas subunidades idênticas de 30 a 72 kDa cada, dependendo do organismo. Cada subunidade contém um grupo ferro-enxofre ($4 Fe$ e $4 S^{2-}$), que participa nas reações redox envolvidas na conversão de N_2 em NH_3 . A Fe-proteína é irreversivelmente inativada por O_2 com uma meia-vida característica de 30 a 45 segundos (Dixon e Wheeler, 1986).
- MoFe-proteína apresenta quatro subunidades, com massa molecular total de 180 a 235 kDa, dependendo da espécie. Cada subunidade apresenta dois grupos Mo-Fe-S. A MoFe-proteína é também inativada pelo oxigênio, com uma meia-vida de 10 minutos no ar.

Na reação geral de redução do nitrogênio (ver Figura 12.12), a ferredoxina atua como um doador de elétrons para Fe-proteína, a qual, por sua vez, hidrolisa ATP e reduz a MoFe-proteína. A MoFe-proteína pode, então, reduzir inúmeros substratos (Ta-



bela 12.4), embora, sob condições naturais, ela reaja somente com N_2 e H^+ . Uma das reações catalisadas pela nitrogenase, a redução do acetileno a etileno, é usada para estimar a atividade da nitrogenase (ver **Tópico 12.2 na Internet**).

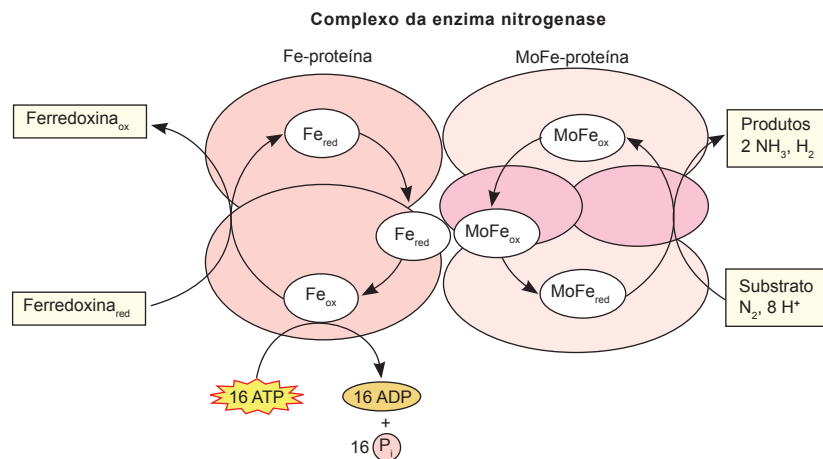
O balanço energético da fixação do nitrogênio é complexo. A produção de NH_3 a partir de N_2 e H_2 é uma reação exergônica (ver **Capítulo 2 na Internet**) para uma discussão de reações exergônicas), com um ΔG° (mudança na energia livre) de -27 kJ mol^{-1} . Entretanto, a produção industrial de NH_3 a partir de N_2 e H_2 é *endergônica*, necessitando-se um grande *input* de energia, devido à energia de ativação necessária para quebrar a ligação tripla do N_2 . Pela mesma razão, a redução enzimática do N_2 pela nitrogenase também requer um grande investimento

de energia (ver Equação 12.9), embora as mudanças exatas na energia livre ainda sejam desconhecidas.

Cálculos baseados no metabolismo de carboidrato de leguminosas indicam que a planta consome 12 g de carbono orgânico por grama de N_2 fixado (Heytler e cols., 1984). Com base na Equação 12.9, o ΔG° para a reação geral da fixação biológica do nitrogênio é cerca de -200 kJ mol^{-1} . Visto que a reação total é altamente exergônica, a produção de amônio é limitada pela ação lenta (número de moléculas de N_2 reduzida por unidade de tempo) do complexo nitrogenase (Ludwig e de Vries, 1986).

Sob condições naturais, quantidades substanciais de H^+ são reduzidas ao gás H_2 . Este processo pode competir com a redução do N_2 pelos elétrons da nitrogenase. Nos rizóbios, 30 a 60% da en-

Figura 12.12 A reação catalisada pela nitrogenase. A ferredoxina reduz a Fe-proteína. Acredita-se que a ligação e a hidrólise do ATP à Fe-proteína provoca uma mudança na conformação dessa proteína, o que facilita as reações redox. A Fe-proteína reduz a MoFe-proteína e esta última reduz o N₂ (Dixon e Wheeler, 1986 e Buchanan e cols., 2000).



ergia fornecida para a nitrogenase podem ser perdidos como H₂, diminuindo a eficiência da fixação do nitrogênio. Alguns rizóbios, entretanto, contêm hidrogenase, uma enzima que pode clivar o H₂ formado e gerar elétrons para a redução do N₂, aumentando, assim, a eficiência da fixação do nitrogênio (Marschner, 1995).

Amidas e ureidas são formas transportadas de nitrogênio

Os organismos procariontes simbióticos fixadores de nitrogênio liberam amônia que, para evitar a toxicidade, deve ser rapidamente convertida em formas orgânicas nos nódulos da raiz, antes de serem transportadas pelo xilema para a parte aérea. As leguminosas fixadoras de nitrogênio podem ser divididas em exportadoras de amidas ou exportadoras de ureidas, com base na composição da seiva do xilema. As amidas (principalmente os aminoácidos asparagina e glutamina) são exportadas por leguminosas de regiões temperadas, tais como ervilha (*Pisum*), trevo (*Trifolium*), fava (*Vicia*) e lentilha (*Lens*).

As ureidas são exportadas por leguminosas de origem tropical, tais como a soja (*Glycine*), o feijão (*Phaseolus*), o amendoim (*Arachis*) e a *Vigna*. As três ureidas principais são alantoína, ácido alantóico e citrulina (Figura 12.13). A alantoína é sintetizada nos peroxissomos a partir do ácido úrico, enquanto o ácido alantóico é sintetizado a partir da alantoína no retículo endoplasmático. O local de síntese da citrulina a partir do aminoácido ornitina não foi ainda determinado. Os três compostos são liberados no xilema e transportados para a parte aérea, onde são rapidamente catabolizados a amônio. Esse amônio entra na rota de assimilação já descrita.

ASSIMILAÇÃO DE ENXOFRE

O enxofre está entre os elementos mais versáteis dos organismos vivos (Hell, 1997). As pontes dissulfídicas em proteínas exercem funções estruturais e reguladoras (ver Capítulo 8). O enxofre participa no transporte de elétrons por meio dos grupos ferro-enxofre (ver Capítulos 7 e 11). Os sítios catalíticos de várias enzimas e co-enzimas, tais como urease e coenzima A, contêm enxofre. Os metabólitos secundários (compostos que não estão envolvidos nas vias primárias de crescimento e de desenvolvimento) que contêm enxofre variam desde os fatores Nod rizobiais, discutidos na seção anterior, ao anti-séptico alina encontrado no alho e ao anticarcinogênico sulforafano, presente no brócolis.

A versatilidade do enxofre deriva, em parte, da propriedade que apresenta em comum com o nitrogênio: *múltiplos estados estáveis de oxidação*. Nesta seção, serão discutidas as etapas enzimáticas que participam da assimilação do enxofre e as reações bioquímicas que catalisam a redução do sulfato em dois aminoácidos contendo enxofre, cisteína e metionina.

O sulfato é a forma de absorção de enxofre nos vegetais

A maioria do enxofre nas células de vegetais superiores deriva do sulfato (SO₄⁻²) absorvido via um transportador H⁺-SO₄⁻² do tipo simporte (ver Capítulo 6), a partir da solução do solo. O sulfato no solo é proveniente sobremaneira do desgaste das rochas. No entanto, a industrialização acrescenta uma fonte adicional de sulfato: a poluição atmosférica. A queima e combustíveis fósseis libera várias formas de enxofre gasoso, incluindo dióxido de enxofre (SO₂) e sulfeto de hidrogênio (H₂S), os quais são levados para o solo pela chuva.

Quando dissolvido em água, o SO₂ é hidrolisado e transforma-se em ácido sulfúrico (H₂SO₄), um ácido forte, que é a principal fonte de chuva ácida. As plantas podem, também, metabolizar o dióxido de enxofre, que é absorvido na forma gasosa através dos estômatos. Entretanto, exposições prolongadas (mais de oito horas) às altas concentrações atmosféricas do SO₂ (maiores do que 0,3 ppm) causam extensos danos nos tecidos, devido à formação do ácido sulfúrico.

TABELA 12.4	
Reações catalisadas pela nitrogenase	
N ₂ → NH ₃	Fixação do nitrogênio molecular
N ₂ O → N ₂ + H ₂ O	Redução do óxido nitroso
N ₃ ⁻ → N ₂ + NH ₃	Redução de azida
C ₂ H ₂ → C ₂ H ₄	Redução de acetileno
2H ⁺ → H ₂	Produção de H ₂
ATP → ADP + P _i	Atividade hidrolítica do ATP

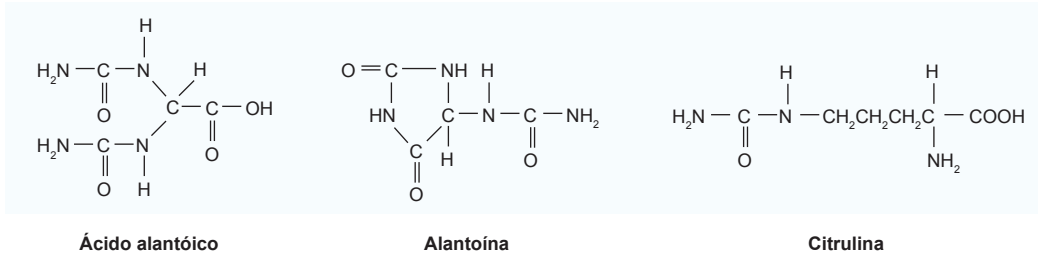


Figura 12.13 As principais ureídas utilizadas para transportar nitrogênio a partir dos locais onde serão desaminados para fornecer nitrogênio para a síntese de aminoácidos e nucleosídeos.

A assimilação do sulfato necessita da redução do sulfato a cisteína

A primeira etapa na síntese de compostos orgânicos contendo enxofre é a redução do sulfato ao aminoácido cisteína (Figura 12.14). O sulfato é muito estável e necessita ser ativado antes que alguma reação subsequente possa ocorrer. A ativação inicia com a reação entre o sulfato e o ATP, para formar 5'-adenililsulfato (o qual é, algumas vezes, referido como adenosina-5'-fosfosulfato e abreviado como APS) e pirofosfato (PPi) (ver Figura 12.14):

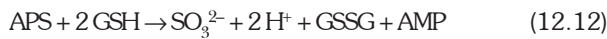


A enzima que catalisa essa reação, ATP sulfúrilase, apresenta duas formas: a maior é encontrada nos plastídeos e menor, no citoplasma (Leustek e cols. 2000). A reação de ativação é energeticamente desfavorável. Para levar essa reação adiante, os produtos APS e PPi devem ser convertidos de imediato em outros compostos. O PPi é hidrolisado a fosfato inorgânico (Pi) pela pirofosfatase inorgânica, de acordo com a seguinte reação:



O outro produto, APS, é rapidamente reduzido ou sulfatado, sendo predominante a via de redução (Leustek e cols., 2000).

A redução do APS é um processo de múltiplas etapas, que ocorre exclusivamente nos plastídeos. De início, A APS redutase, aparentemente, transfere dois elétrons da glutatona reduzida (GSH) para produzir sulfito (SO₃²⁻):

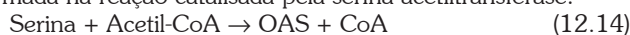


Onde GSSG representa a glutatona oxidada. (o SH em GSH e o SS em GSSg representam as pontes S-H e S-S, respectivamente).

A seguir, a sulfito redutase transfere seis elétrons da ferredoxina (Fd_{red}) para produzir sulfeto (S²⁻):



O sulfeto resultante reage com O-acetilserina (OAS) para formar cisteína e acetato. A O-acetilserina, que reage com o S²⁻, é formada na reação catalisada pela serina acetiltransferase:



A reação que produz cisteína e acetato é catalisada pela OAS tiol-liase:



A sulfatação do APS, localizada no citosol, é a via alternativa. Inicialmente, a APS quinase catalisa a reação da APS com ATP, para formar 3'-fosfoadenosina-5' - fosfosulfato (PAPS).

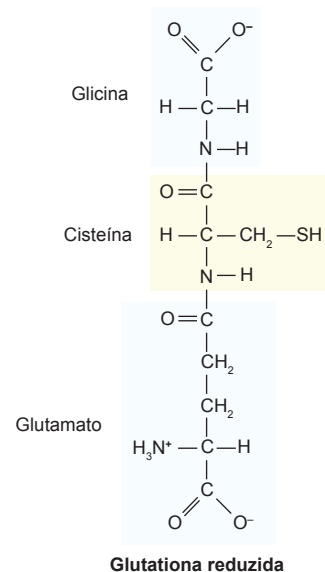


As sulfotransferases, então, podem transferir o grupo sulfato do PAPS para vários compostos, incluindo colina, brassinosteróides, flavonol, ácido gálico glicosídeo, glucosinolatos, peptídeos e polissacarídeos (Leustek e Saito, 1999).

A assimilação do sulfato ocorre principalmente nas folhas

A redução do sulfato à cisteína altera o número de oxidação do enxofre de +6 para -4, assim necessitando da transferência de 10 elétrons. A glutatona, a ferredoxina, o NAD(P)H ou a O-acetilserina podem atuar como doadores de elétrons em vários passos da rota metabólica (ver Figura 12.14).

Na assimilação do enxofre, as folhas são em geral mais ativas do que as raízes, provavelmente devido ao fato da fotossíntese disponibilizar a ferredoxina reduzida e a fotorrespiração gerar a serina, que pode estimular a produção da O-acetilserina (ver Capítulo 8). O enxofre assimilado nas folhas é exportado pelo floema para os locais de síntese proteica (frutos e ápices caulinares e radiculares), sobretudo na forma de glutatona (Bergmann e Rennenberg, 1993):



A glutatona também atua como um sinal que coordena a absorção do sulfato pelas raízes e assimilação do sulfato pela parte aérea.

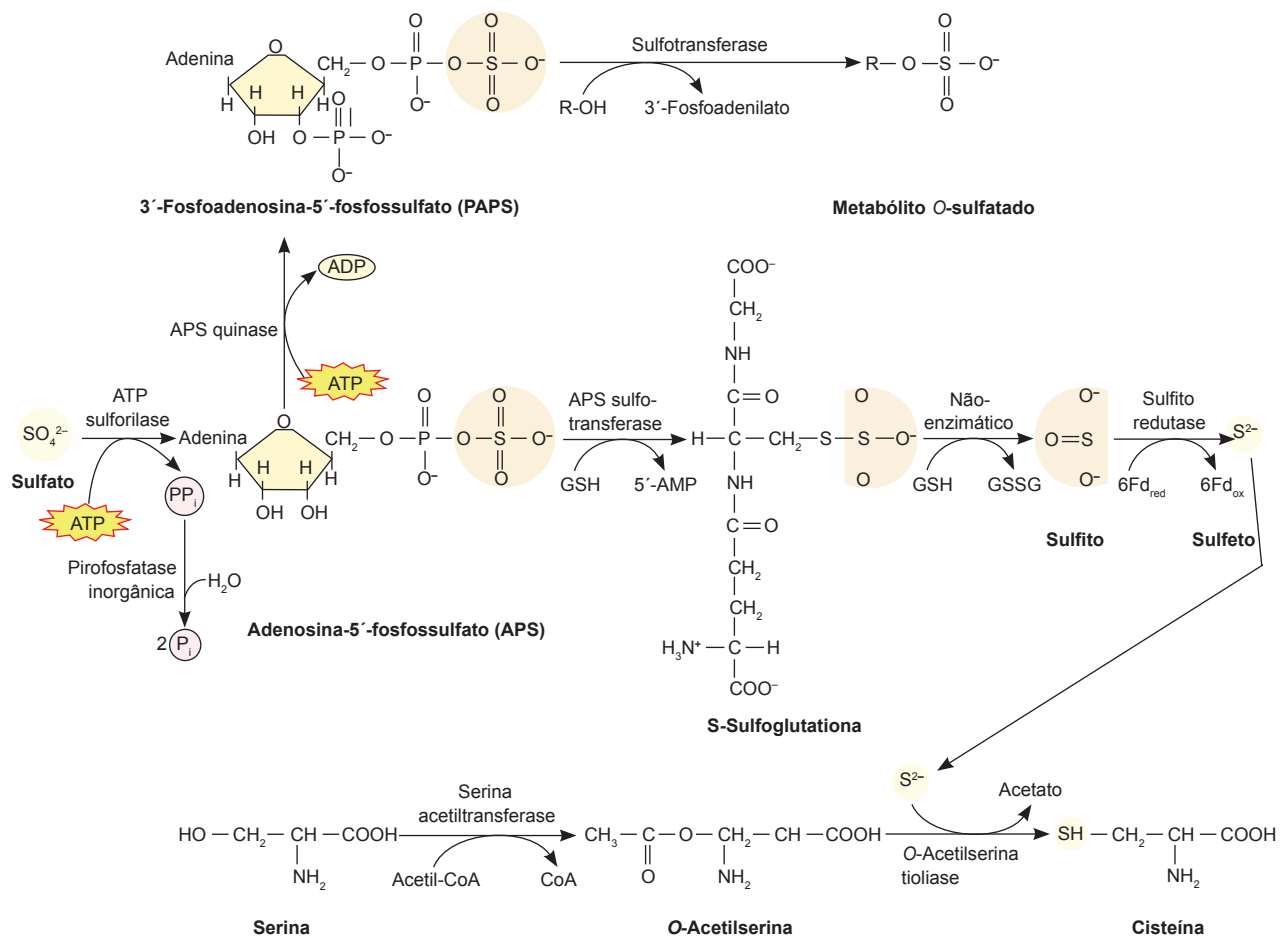


Figura 12.14 Estrutura e rotas metabólicas dos compostos envolvidos na assimilação do enxofre. A enzima ATP sulfonilase cliva o pirofosfato do ATP e o substitui com o sulfato. O sulfeto é produzido a partir do APS por reações que envolvem a redução pela glutatona e ferredoxina. O sulfeto ou tiossulfeto reagem com a O-acetilserina para formar cisteína. Fd, ferredoxina; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada.

A metionina é sintetizada a partir da cisteína

A metionina, um outro aminoácido contendo enxofre encontrado nas proteínas, é sintetizada nos plástideos a partir da cisteína (para maiores detalhes ver **Tópico 12.3 na Internet**). Após as sínteses da cisteína e da metionina, o enxofre pode ser incorporado nas proteínas e em diversos outros compostos, tais como a acetil CoA e o S-adenosilmetionina, sendo este último um composto muito importante para a síntese do etileno (ver Capítulo 22), e em reações envolvendo a transferências de grupos metil, como na síntese da lignina (ver Capítulo 13).

ASSIMILAÇÃO DO FOSFATO

O fosfato (HPO_4^{2-}) na solução do solo é rapidamente absorvido pelas raízes das plantas por intermédio de um transportador de $\text{H}^+\text{-HPO}_4^{2-}$ do tipo simporte (ver Capítulo 6) e incorporado

em uma variedade de compostos orgânicos, incluindo açúcares fosfatos, fosfolipídeos e nucleotídeos. O principal ponto de entrada do fosfato na via de assimilação ocorre durante a formação do ATP, a molécula de energia da célula. Nessa reação, o fosfato inorgânico é adicionado ao segundo grupo fosfato da adenosina difosfato para formar a ligação éster fosfato.

Na mitocôndria, a energia para a síntese do ATP é proveniente da oxidação do NADH pela fosforilação oxidativa (ver Capítulo 11). O ATP é também sintetizado segundo reações da fosforilação dependente da luz que ocorrem no cloroplasto (ver Capítulo 7). Além destas reações que ocorrem nas mitocôndrias e nos cloroplastos, aquelas que ocorrem no citosol também assimilam fosfato.

A glicólise incorpora o fosfato inorgânico no ácido 1-3-difosfoglicérico, formando um grupo acil fosfato de alta energia. Este fosfato pode ser doado para o ADP para formar o ATP, em uma reação de fosforilação em nível de substrato (ver Capítulo 11). Uma vez o fosfato incorporado ao ATP, o grupo fosfato pode ser transferido por intermédio de muitas reações diferen-

tes, para formar vários compostos fosforilados encontrados nas células dos vegetais superiores.

ASSIMILAÇÃO DE CÁTIONS

Os cátions absorvidos pelas células vegetais formam complexos com compostos orgânicos, nos quais o cátion se torna ligado ao complexo por ligações não-covalentes (para discussão de ligações não-covalentes, ver **Capítulo 2 na Internet**). As plantas assimilam macronutrientes catiônicos como potássio, magnésio e cálcio, assim como micronutrientes catiônicos – cobre, ferro, manganês, cobalto, sódio e zinco.

Nesta seção, serão descritas as ligações eletrostáticas e de valência coordenada, as quais fazem parte da assimilação de vários cátions que as plantas utilizam como nutrientes e as exigências especiais para a absorção do ferro pelas raízes e sua subsequente assimilação nas plantas.

Os cátions formam ligações não-covalentes com compostos de carbono

As ligações não-covalentes são de dois tipos: ligações de valência coordenada e ligações eletrostáticas. Na formação de um complexo de valência coordenada, vários átomos de oxigênio ou nitrogênio de um composto de carbono doam elétrons não-compartilhados para formar uma ligação com o nutriente catiônico. Como resultado, a carga positiva do cátion é neutralizada.

As *ligações de valência coordenada* formam-se tipicamente entre cátions polivalentes e moléculas de carbono – por exemplo, complexos entre o cobre e o ácido tartárico (Figura 12.15 A) ou entre o magnésio ea clorofila (Figura 12.15B). Os nutrientes que são assimilados como exemplo de valência coordenada incluem o cobre, o zinco, o ferro e o magnésio. O cálcio também pode formar um complexo de valência coordenada com o ácido poligalacturônico das paredes celulares (Figura 12.15C).

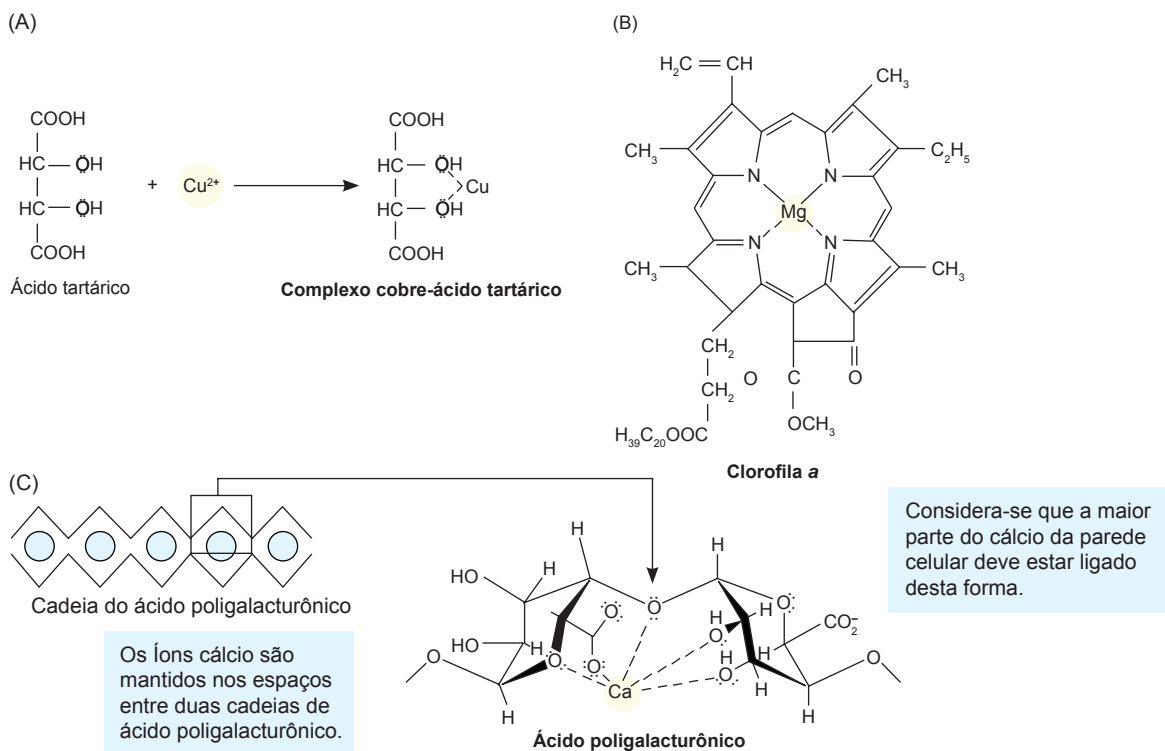


Figura 12.15 Exemplos de complexos de valência coordenada. Os complexos de valência coordenada são formados quando os átomos de oxigênio ou nitrogênio, do composto do carbono, doam pares de elétrons não-compartilhados (representados por pontos) para formar uma ligação com o cátion. (A) Íons cobre compartilham elétrons com os oxigênios das hidroxilas do ácido tartárico. (B) Íons magnésio compartilham elétrons com os átomos de nitrogênios da clorofila a. As linhas tracejadas representam as ligações de valência coordenada entre elétrons não-compartilhados dos átomos de nitrogênio e do cátion magnésio. (C) O modelo de “caixa de ovos” da interação do ácido poligalacturônico, o principal constituinte das pectinas nas paredes celulares, e os íons cálcio. Na direita está representado, de forma aumentada, a formação de um complexo de valência coordenada entre um único íon cálcio com os oxigênios das hidroxilas dos resíduos do ácido galacturônico. (Rees, 1977).

As ligações eletrostáticas são formadas devido à atração de um cátion carregado positivamente por um grupo carregado negativamente, como o carboxilato ($-\text{COO}^-$) em um composto de carbono. Ao contrário da situação das ligações coordenadas, o cátion em uma ligação eletrostática mantém a sua carga positiva. Os cátions monovalentes, como o potássio (K^+), podem formar ligações eletrostáticas com os grupos carboxílicos de muitos ácidos orgânicos (Figura 12.16A). Entretanto, grande parte do potássio que é acumulado pelas células vegetais e que atua na regulação osmótica e na ativação enzimática permanece no citosol e nos vacúolos como íon livre. Os íons divalentes, como o cálcio, formam ligações eletrostáticas com os pectatos (Figura 12.16B) e os grupos carboxílicos dos ácidos poligalacturônicos (ver Capítulo 15).

Em geral, cátions como magnésio (Mg^{2+}) e o Cálcio (Ca^{2+}) são assimilados pela formação de complexos de valência coordenada e ligações eletrostáticas com aminoácidos, fosfolipídeos e outras moléculas carregadas negativamente.

As raízes modificam a rizosfera para absorver o ferro

O ferro é importante nas proteínas ferro-enxofre (ver Capítulo 7) e como catalisador de enzimas que participam nas reações de redox (ver Capítulo 5), como aquelas do metabolismo do nitrogênio aqui discutidas. As plantas obtêm o ferro do solo, onde ele está presente primariamente como ferro férrico (Fe^{3+}) em óxidos como o $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ e $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$. Em pH neutro, o ferro férrico é altamente insolúvel. Para que quantidades suficientes do ferro sejam absorvidas da solução do solo, as raízes necessitam desenvolver vários mecanismos para aumentar a solubilidade e a disponibilidade do ferro. Tais mecanismo incluem:

- Aumento da solubilidade do ferro férrico pela acidificação do solo.
- Redução do ferro férrico a forma ferrosa (Fe^{2+}) mais solúvel.
- Liberação de compostos que formam complexos estáveis e solúveis com o ferro (Marschner, 1995). Rever o Capítulo 5, no qual esses compostos são chamados de quelantes do ferro (ver Figura 5.2).

Em geral, as raízes acidificam o solo ao seu redor. Elas exsudam prótons durante a absorção e a assimilação dos cátions, em especial amônio, e liberam compostos orgânicos, como os ácidos málico e cítrico, que aumentam a disponibilidade do ferro e do fosfato (ver Figura 5.4). A deficiência do ferro estimula a exsudação de prótons pelas raízes. Além disso, as membranas plasmáticas da raiz possuem uma enzima, a *redutase ferroquelante*, que reduz o ferro férrico à forma ferro ferroso, onde o NADH ou o NADPH servem como doadores de elétrons. A atividade dessa enzima aumenta sob condições de deficiência de ferro.

Vários compostos secretados pelas raízes formam quelados estáveis com o ferro. Os exemplos incluem o ácido málico, o ácido cítrico, os fenólicos e o ácido piscídico. As gramíneas produzem uma classe especial de quelantes do ferro denominadas de *fitosideróforos*. Os fitosideróforos são constituídos por aminoácidos que não são encontrados nas proteínas, como ácido muginéico, por exemplo, e formam complexos estáveis com o Fe^{3+} . As células das raízes das gramíneas possuem um sistema de transporte de fitosideróforo- Fe^{3+} , que carrega o quelado para o interior do citoplasmas. Sob deficiência de ferro, as raízes das gramíneas liberam mais fitosideróforos no solo e aumentam a capacidade do sistema de transporte do fitosideróforo- Fe^{3+} .

O ferro forma complexos com o carbono e com o fosfato

Uma vez que as raízes tenham absorvido ferro ou um ferro quelado, eles são oxidados nas raízes à forma férrica e translocados, em sua maior parte, para as folhas, na forma de complexos eletrostáticos com o citrato.

A maior parte do ferro nos vegetais é encontrada na molécula heme do citocromo, nos cloroplastos e nas mitocôndrias (ver Capítulo 7). Uma importante reação de assimilação do ferro é a sua inserção na porfirina, a qual é precursora do grupo heme. Essa reação é catalisada pela enzima ferroquelatase (Figura 12.17) (Jones, 1983). Além disso, as proteínas ferro-enxofre da cadeia transportadora de elétrons (ver Capítulo 7) contêm ferro não-heme covalentemente ligado aos átomos de enxofre dos resíduos de cisteína na apoproteína. O ferro é encontrado tam-

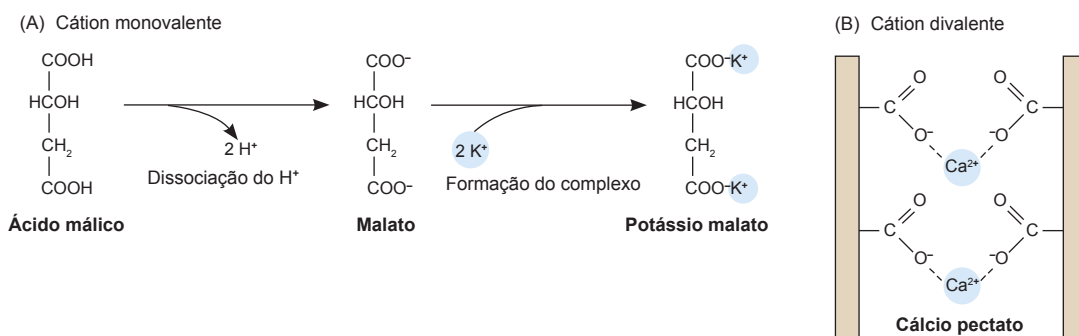


Figura 12.16 Exemplos de complexos eletrostáticos (iônicos). (A) O cátion K^+ monovalente e o malato formam o complexo potássio malato. (B) O cátion divalente Ca^{2+} e o pectato formam o complexo cálcio pectato. Os cátions divalentes podem formar ligações cruzadas entre as bordas paralelas que possuem grupos carboxila negativamente carregados. As ligações do cálcio exercem um papel estrutural nas paredes celulares.

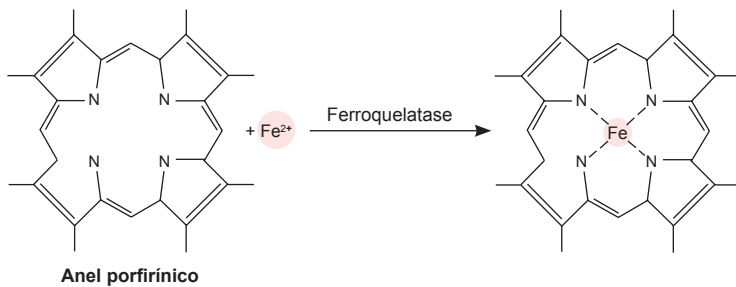


Figura 12.17 Reação da ferroquelatase. A enzima ferroquelatase catalisa a inserção do ferro no anel da porfirina para formar o complexo de valência coordenada. Ver a Figura 7.37 para ilustração da biossíntese do anel da porfirina.

bém nos centros Fe_2S_2 , os quais possuem dois ferros (cada um complexado com os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína) e dois sulfetos inorgânicos.

O ferro livre (ferro que não está complexado com compostos de carbono) pode interagir com o oxigênio para formar ânions superóxidos (O_2^-), os quais podem danificar membranas pela degradação dos componentes lipídicos insaturados. As células vegetais podem limitar os danos armazenando o excesso de ferro em complexos de ferro-proteína chamados de **fitoferritina** (Bienfait e Van der Mark, 1983). A fitoferritina consiste de uma estrutura protéica com 24 subunidades idênticas formando uma esfera oca que possui uma massa molecular de cerca de 480 kDa. No interior dessa esfera, há um núcleo de 5.400 a 6.200 átomos de ferro presentes como um complexo fosfato-óxido férrico.

A forma pela qual o ferro é liberado da fitoferritina não é conhecida, porém a quebra da estrutura protéica parece estar envolvida neste processo. O nível de ferro livre nas células vegetais regula a biossíntese *de novo* da fitoferritina (Lobreaux e cols., 1992).

ASSIMILAÇÃO DO OXIGÊNIO

A respiração responde por aproximadamente de 90% do volume de oxigênio (O_2) assimilado pelas células vegetais (ver Capítulo 11). Uma outra rota importante para a assimilação do O_2 em compostos orgânicos envolve a incorporação do O_2 a partir da água (ver reação 1 da Tabela 8.1). Uma pequena proporção do oxigênio pode ser diretamente assimilada em compostos orgânicos no processo de *fixação de oxigênio*.

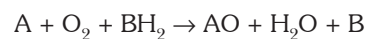
Na fixação de oxigênio, o oxigênio molecular é adicionado diretamente a um composto orgânico em reações realizadas por enzimas conhecidas como oxigenases. Lembre-se do Capítulo 8, no qual o oxigênio é diretamente incorporado em um composto orgânico durante a fotorrespiração, em uma reação que envolve a atividade oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), a enzima de fixação do CO_2 (Ogren, 1984). O primeiro produto estável que contém oxigênio a partir da forma molecular é o 2-fosfoglicolato.

Em geral, as oxigenases são classificadas como dioxigenases ou monoxigenases, conforme o número de átomos de oxigênio que são transferidos a um composto de carbono na reação catalisada. Nas reações de **dioxigenases**, ambos os átomos de oxigênio são incorporados em um ou dois compostos de carbono (Figura 12.18A e B). Os exemplos de dioxigenases nas células vegetais são as lipoxigenases, que catalisam a adição de dois átomos de oxigênio aos ácidos graxos insaturados (ver Figura 12.18A) e a prolil hidroxilase, a enzima que

converte prolina ao aminoácido pouco comum hidroxiprolina (ver Figura 12.18B).

A hidroxiprolina é um importante componente da extensina, uma proteína da parede celular (ver Capítulo 15). A síntese de todos os outros aminoácidos, pois a reação ocorre após a prolina ter sido incorporada na proteína e é, portanto, uma reação de modificação pós-traducional. A prolil hidroxilase está localizada no retículo endoplasmático, sugerindo que a maior parte das proteínas contendo hidroxiprolina é encontrada na via secretora.

As **monoxigenases** adicionam um dos átomos do oxigênio molecular a um composto de carbono; o outro átomo de oxigênio é convertido em água. As monoxigenases são algumas vezes referidas como *oxidases de função mista* devido à sua capacidade de catalisar simultaneamente a reação de oxigenação e a reação oxidase (redução do oxigênio a água). A reação monoxigenase também necessita de um substrato reduzido (NADH ou NADPH) como um doador de elétrons, de acordo com a seguinte equação:



onde A representa o composto orgânico e B representa o doador de elétrons.

Uma importante monoxigenase vegetal é a família das heme-proteínas, coletivamente chamadas de citocromo P450, as quais catalisam a hidroxilação do ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico (Figura 12.18C). Nas monoxigenases, o oxigênio é primeiramente ativado por ser combinado com o átomo de ferro do grupo heme; o NADPH serve como um doador de elétrons. O sistema oxidase de função mista está localizado no retículo endoplasmático e é capaz de oxidar vários substratos, incluindo mono e diterpenos e ácidos graxos.

O BALANÇO ENERGÉTICO DA ASSIMILAÇÃO DE NUTRIENTES

A assimilação de nutrientes geralmente necessita de grandes quantidades de energia para converter compostos inorgânicos estáveis de baixa energia em compostos inorgânicos de alta energia. Por exemplo, a redução do nitrato a nitrito e este em amônio requer a transferência de cerca de 10 elétrons e responde por cerca de 25% do total de energia consumida pelas raízes e partes aéreas (Bloom, 1997). Conseqüentemente, o vegetal pode utilizar um quarto da sua energia para assimilar o nitrogênio, um constituinte que representa menos de 2% do peso seco total da planta.

Muitas das reações de assimilação ocorrem no estroma do cloroplasto, onde elas têm acesso imediato a poderosos agentes

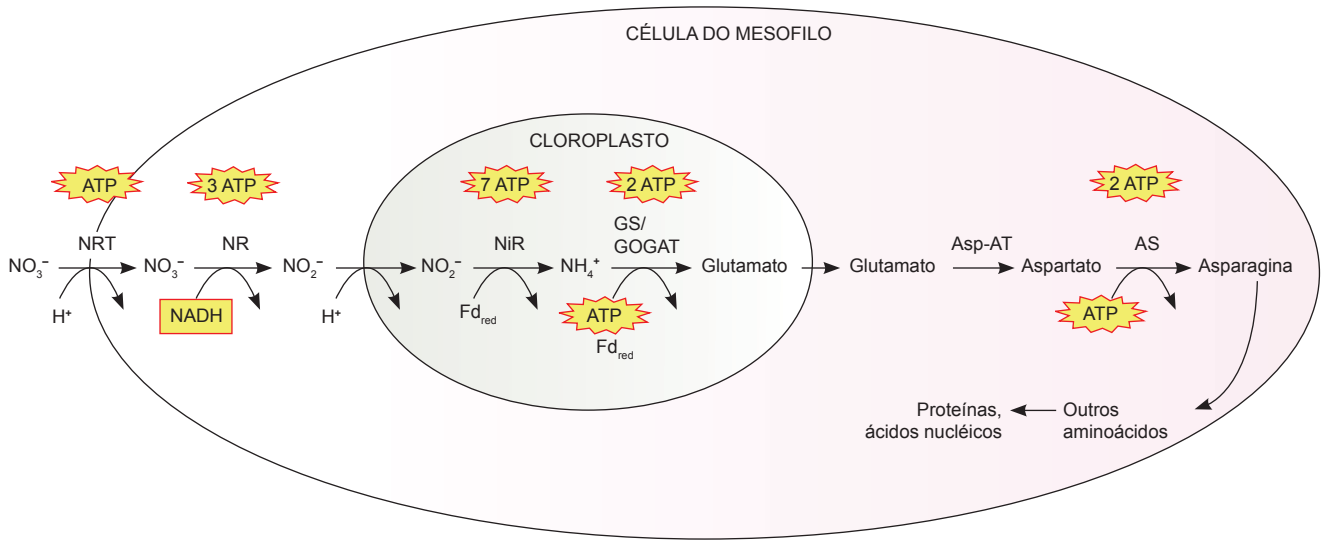


Figura 12.19 Resumo dos processos envolvidos na assimilação do nitrogênio mineral na folha. O nitrato translocado das raízes pelo xilema é absorvido por uma célula do mesofilo através de um dos simportes nitrato-próton (NRT) para o citoplasma. O nitrato é, então, reduzido a nitrito via nitrato redutase (NR). O nitrito é translocado para o estroma do cloroplasto junto com um próton. No estroma, o nitrito é reduzido à amônio, via nitrato redutase (NiR) e esse amônio é convertido em glutamato pela ação sequencial da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT). Novamente no citoplasma, o glutamato é transaminado a aspartato, via aspartato aminotransferase (Asp-AT). Finalmente, a asparagina sintetase (AS) converte o aspartato em asparagina. As quantidades aproximadas de ATP equivalente para cada reação estão indicadas acima.

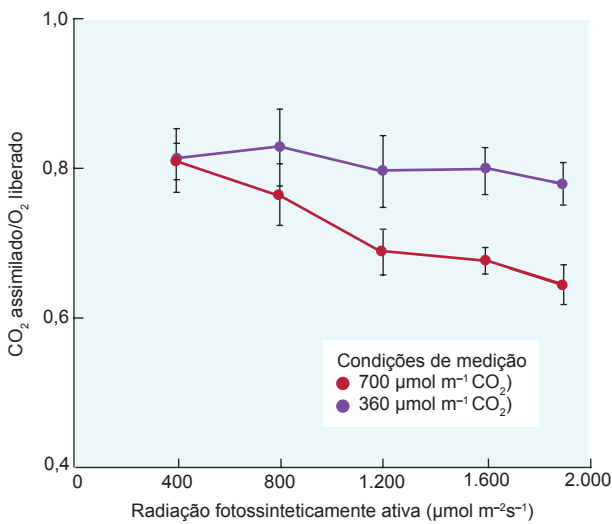


Figura 12.20 Quociente de assimilação (QA = CO₂ assimilado/O₂ liberado) de plântulas de trigo como uma função da quantidade de luz (radiação fotossinteticamente ativa). A fotoassimilação do nitrato está diretamente relacionada com o quociente de assimilação, pois a transferência de elétrons para o nitrato e nitrito durante a fotoassimilação aumenta a liberação de O₂ a partir das reações fotossintéticas dependentes de luz, enquanto a assimilação de CO₂ pelas reações independentes da luz continua em taxas similares. Entretanto, plantas que estão fotoassimilando o nitrato exibem um QA menor. Nas medidas realizadas no ambiente, em concentrações de 360 μmol mol⁻¹ CO₂ (linha vermelha), QA diminui como uma função da radiação incidente, indicando que as taxas de fotoassimilação aumentaram. Em concentrações elevadas (700 μmol mol⁻¹ CO₂, linha azul), o QA permanece constante em todos os níveis de luz utilizados, indicando que as reações de fixação do CO₂ estão competindo por agentes redutores, inibindo a fotoassimilação (Bloom e cols., 2002).

O amônio, derivado da absorção da raiz ou produzido por assimilação do nitrato ou da fotorrespiração, é convertido a glutamina e glutamato pelas ações sequenciais da glutamina sintetase e da glutamato sintase, as quais estão localizadas no citosol e nos plastídeos das raízes ou dos cloroplastos.

Uma vez assimilado em glutamina ou glutamato, o nitrogênio pode ser transferido para muitos outros compostos orgânicos

através de diversas reações, incluindo as de transaminação. A interconversão entre a glutamina e a asparagina pela asparagina sintetase equilibra o metabolismo do carbono e do nitrogênio em uma planta.

Muitas plantas formam uma relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio que contêm um complexo enzimático, a nitrogenase, que pode reduzir o nitrogênio atmosférico em

amônia. Plantas leguminosas e actinorrízicas formam associações com rizóbios e *Frankia*, respectivamente. Tais associações são o resultado de uma excelente sintonia na interação entre o simbionte e a planta hospedeira, envolvendo o reconhecimento de sinais específicos, a indução de um programa de desenvolvimento especializado na planta, a absorção de bactérias pela planta e o desenvolvimento de nódulos, os únicos órgãos que abrigam bactérias nas células vegetais. Alguns microorganismos procariontes fixadores de nitrogênio não formam relações simbióticas com plantas superiores, porém beneficiam as plantas pelo aumento dos níveis de nitrogênio do solo.

Semelhante ao nitrato, o sulfato (SO_4^{2-}) deve ser reduzido pela assimilação. Na redução do sulfato, é produzida uma forma ativada do sulfato, denominada 5'-adenililsulfato (APS). O sulfeto (S^{2-}), produto final da redução do sulfato, não é acumulado nas células, mas, ao contrário, é rapidamente incorporado nos aminoácidos cisteína e metionina.

O fosfato (HPO_4^{2-}) está presente em uma variedade de compostos encontrados nas células vegetais, incluindo açúcares fosfatos, lipídeos, ácidos nucleicos e nucleotídeos livres. O produto inicial da sua assimilação é o ATP, o qual é produzido por fosforilações em nível de substrato no citosol, na fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e na fosforilação nos cloroplastos.

Enquanto a assimilação do nitrogênio, do enxofre e do fósforo necessita da formação de ligações covalentes com compostos de carbono, muitos macro e micronutrientes catiônicos (p. ex. K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , Zn^{2+}) simplesmente formam complexos. Esses complexos podem ser mantidos por ligações eletrostáticas ou por ligações de valência coordenada.

A assimilação do ferro pode envolver a quelatação, as reações de oxidorredução e a formação de complexos. A fim de armazenar grandes quantidades de ferro, as células vegetais sintetizam fitoferritina, uma proteína que armazena o ferro. Uma importante função do ferro nas células vegetais é agir como um componente redox no sítio ativo de enzimas, freqüentemente como um complexo ferro-porfirina. O ferro é inserido em um grupo porfirínico na reação da ferroquelatase.

Além de ser utilizado na respiração, o oxigênio molecular pode ser assimilado no processo de fixação de oxigênio, no qual ocorre a adição direta de oxigênio aos compostos orgânicos. Tal processo é catalisado por enzimas conhecidas como oxigenases, classificadas como monoxigenases ou dioxygenases.

A assimilação de nutrientes necessita de grandes quantidades de energia para converter compostos inorgânicos estáveis de baixa energia em compostos orgânicos com alta energia. Uma planta pode utilizar a energia da fotossíntese para assimilar compostos inorgânicos no processo denominado fotoassimilação.

Material da Internet

Tópicos da Internet

12.1 Desenvolvimento de nódulos na raiz

Os primórdios dos nódulos são formados na região oposta aos pólos do protóxilema do feixe vascular da raiz.

12.2 Medição da fixação de nitrogênio

A redução do acetileno é utilizada como uma medida indireta da redução do nitrogênio.

12.3 A síntese da metionina

A metionina é sintetizada nos plátides a partir da cisteína.

Ensaio da Internet

12.1 O CO₂ elevado e a fotoassimilação do nitrogênio

Nas folhas que se desenvolvem sob altas concentrações de CO₂, o gás carbônico inibe a fotoassimilação do nitrogênio, pois compete pelos agentes redutores.

Referências bibliográficas

- Becker, T W., Perrot-Rechenmann, C., Suzuki, A., and Hirel, B. (1993) Subcellular and immunocytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of maize leaves. *Planta* 191: 129-136.
- Bergmann, L., and Rennenberg, H. (1993) Glutathione metabolism in plants. In *Sufiir Nutrition and Assimilation in Higher Plants. Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects*, L. J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold, and W.E. Rausser, eds., SPB Acad. Pub., The Hague, Netherlands, pp. 109-123.
- Bienfait, H. E., and Van der Mark, E. (1983) Phytoferritin and its role in iron metabolism. In *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants*, D. A. Robb and W. S. Pierpoint, eds., Academic Press, New York, pp. 111-123.
- Bloom, A. J. (1997) Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate. In *Ecology in Agriculture*, L. E. Jackson, ed., Academic Press, San Diego, CA, pp.145-172.
- Bloom, A. J., Smart, D. R., Nguyen, D. T., and Searles, P. S. (2002) Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1730-1735.
- Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., and Warner, R. L. (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* 99:1294-1301.
- Buichanan, B., Grissem, W., and Jones, R., eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD.
- Burris, R. H. (1976) Nitrogen fixation. In *Plant Biochemistry*, 3rd ed., J. Bonner and J. Varner, eds., Academic Press New York, pp. 887-908.
- Campbell, W. H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:277-303.
- Carlson, R. W., Forsberg, L. S., Price, N. P. J., Bhat, U. R., Kelly, T. M., and Raetz, C. R. H. (1995) The structure and biosynthesis of *Rhizobium leguminosarum* lipid A. In *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 392: *Bacterial Endotoxins: Lipopolysaccharides from Genes to Therapy: Proceedings of the Third Conference of the International Endotoxin Society*, held in Helsinki, Finland, on August 15-18, 1994, J. Levin et al., John Wiley and Sons, New York, pp. 2-31.
- Denison, R. F., and Harter, B. L. (1995) Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. *Plant Physiol.* 107: 1355-1364.
- Dixon, R. O. D., and Wheeler, C. T. (1986) *Nitrogen Fixation in Plants*. Chapman and Hall, New York.
- Dong, Z., Canny M. J., McCully, M. E., Roboredo, M. R., Cabadilla, C. F., Ortega, E., and Rodes, R. (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* 105: 1139-1147.
- Etzler, M. E., Kalsi, G., Ewing, N. N., Roberts, N. J., Day, R. B., and Murphy, J. B. (1999) A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 58565861.

- FAOSTAT. (2001) *Agricultural Data*. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Heidstra, R., and Bisseling, T. (1996) Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytol.* 133: 25-13.
- Hell, R. (1997) Molecular physiology of plants sulfur metabolism. *Planta* 202: 138-148.
- Heyder, P. G., Reddy, G. S., and Hardy, R. W. F. (1984) *In vivo* energetics of symbiotic nitrogen fixation in soybeans. In *Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism*, P. W. Ludden and I. E. Burris, eds., Elsevier, New York, pp. 283-292.
- Jones, O. T. G. (1983) Ferrochelatase. In *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by plants*, D. A. Robb and W. S. Pierpoint, eds., Academic Press, New York, pp. 125-144.
- Kaiser, W. M., Weiner, H., and Huber, S. C. (1999) Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol. Plant.* 105: 385-390.
- Kleinohfs, A., Warner, R. L., Lawrence, J. M., Melzer, J. M., Jeter, J. M., and Kudrna, D. A. (1989) Molecular genetics of nitrate reductase in barley. In *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*, J. L. Wray and J. R. Kinghorn, eds., Oxford Science, New York, pp. 197-211.
- Kuzna, M. M., Hunt, S., and Layzell, D. B. (1993) Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiol.* 101: 161-169.
- Lam, H.-M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G. M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.
- Lazarowitz, S. G., and Bisseling, T. (1997) Plant development from the cellular perspective: Integrating the signal (Cellular Integration of Signaling Pathways in Plant Development, Acquafredda de Maratea, Italy, May 20-30, 1997). *Plant Cell* 9: 1884-1900.
- Lea, P. J., Blackwell, R. D., and Joy, K. W. (1992) Ammonia assimilation in higher plants. In *Nitrogen Metabolism of Plants* (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 33), K. Mengel and D. J. Pilbeam, eds., Clarendon, Oxford, pp. 153-186.
- Leustek, T., and Saito, K. (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* 120: 637-643.
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J.-A., and Davies, J. P. (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 141-165.
- Lobreaux, S., Massenet, O., and Briat, J.-F. (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19: 563-575.
- Ludwig, R. A., and Vries, G. E. (1986) Biochemical physiology of *Rhizobium* dinitrogen fixation. In *Nitrogen Fixation*, Vol. 4: *Molecular Biology*, W. I. Broughton and S. Puhler, eds., Clarendon, Oxford, pp. 50-69.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. Academic Press, London.
- Mendel, R. R., and Stallmeyer, B. (1995) Molybdenum cofactor (nitrate reductase) biosynthesis in plants: First molecular analysis. In *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Vol. 22: *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology: Proceedings of the VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*, Florence, Italy, 12-17 June, 1994, M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna, eds. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 577-582.
- Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-885.
- Oaks, A. (1994) Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-750.
- Ogren, W. L. (1984) Photorespiration: Pathways, regulation, and modification. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 415-442.
- Pate, J. S. (1983) Patterns of nitrogen metabolism in higher plants and their ecological significance. In *Nitrogen as an Ecological Factor: The 22nd Symposium of the British Ecological Society*, Oxford 1981, J. A. Lee, S. McNeill, and I. H. Rorison, eds., Blackwell, Boston, pp. 225-255.
- Pate, J. S., and Layzell, D. B. (1990) Energetics and biological costs of nitrogen assimilation. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 16: *Intermediary Nitrogen Metabolism*, B. J. Mifflin and P. J. Lea, eds. Academic Press, San Diego, CA, pp. 1-12.
- Phillips, D. A., and Kapulnik, Y. (1995) Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol.* 3: 58-64.
- Rees, D. A. (1977) *Polysaccharide Shapes*. Chapman and Hall, London.
- Reis, V. M., Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., and Dobereiner, J. (2000) Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 227-247.
- Robinson, J. M. (1988) Spinach leaf chloroplast carbon dioxide and nitrite photoassimilations do not compete for photogenerated reductant: Manipulation of reductant levels by quantum flux density titrations. *Plant Physiol.* 88: 1373-1380.
- Rolfe, B. G., and Gresshoff, P. M. (1988) Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 297-320.
- Schlesinger, W. H. (1997) *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Siegel, L. M., and Wilkerson, J. Q. (1989) Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. In *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*, J. L. Wray and J. R. Kinghorn, eds., Oxford Science, Oxford, pp. 263-283.
- Sivasankar, S., and Oaks, A. (1996) Nitrate assimilation in higher plants-The effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 609-620.
- Stokkermans, T. J. W., Ikeshita, S., Cohn, J., Carlson, R. W., Stacey, G., Ogawa, T., and Peters. N. K. (1995) Structural requirements of synthetic and natural product lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on *Glycine soja*. *Plant Physiol.* 108: 1587-1595.
- Timmers, A. C. J., Auriac, M.-C., and Truchet, G. (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago*: Interaction in relation with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126: 3617-3628.
- Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. (1995) Review: Genetics of the Azospirillum-plant root association. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 445-466.
- Van Rhijn, P., Goldberg, R. B., and Hirsch, A. M. (1998) Lotus corniculatus nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* 10: 1233-1249.
- Warner, R. L., and Kleinohfs, A. (1992) Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiol. Plant* 85: 245-252.
- Wray, J. L. (1993) Molecular biology, genetics and regulation of nitrite reduction in higher plants. *Physiol. Plants* 89: 607-612.