

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE AGROBIOLOGIA**

**TESE**

***DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS EXPORTADOS  
PELOS NÓDULOS DE SOJA (*Glycine max*), ATRAVÉS DO USO DE  
TRAÇADORES ENRIQUECIDOS COM  $^{14}\text{C}$ .***

**SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

**1997**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO  
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA  
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE AGROBIOLOGIA**

***DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS EXPORTADOS  
PELOS NÓDULOS DE SOJA (*Glycine max*), ATRAVÉS DO USO DE  
TRAÇADORES ENRIQUECIDOS COM  $^{14}\text{C}$ .***

**SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

**SOB A ORIENTAÇÃO DA Dra: MARIA CRISTINA PRATA NEVES  
CO-ORIENTAÇÃO DA Dra: NORMA GOUVÉA RUMJANEK**

Tese submetida como requisito parcial  
para a obtenção do grau de “Magister  
Scientiae” em Agronomia em Ciência do  
Solo.

**Seropédica, Rio de Janeiro**

**Outubro de 1997**

631.84  
A36802  
L

***DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS EXPORTADOS  
PELOS NÓDULOS DE SOJA (*Glycine max*), ATRAVÉS DO USO DE  
TRAÇADORES ENRIQUECIDOS COM  $^{14}C$ .***

**AUTOR**

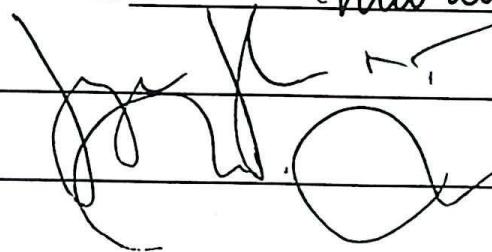
**SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

**APROVADO EM 29/10/97**

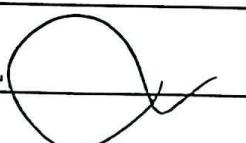
**Dra. Maria Cristina Prata Neves**



**Dr. Jorge Jacob-Neto**



**Dra. Nídia Majerowicz**



Haverá na face de todos um profundo assombro  
E na face de alguns risos sutis cheios de reserva  
Muitos se reunirão em lugares desertos  
E falarão em voz baixa em novos possíveis milagres  
Como se o milagre tivesse realmente se realizado  
Muitos sentirão alegria  
Porque deles é o primeiro milagre  
E darão o óbolo do fariseu com ares humildes  
Muitos não compreenderão  
Porque suas inteligências vão somente até os processos  
E já existem nos processos tantas dificuldades...  
Alguns verão e julgarão com a alma  
Outros verão e julgarão com a alma que eles não têm  
Ouvirão apenas dizer...

Será belo e será ridículo

Haverá quem mude com os ventos

E haverá quem permaneça na pureza dos rochedos  
No meio de todos eu ouvirei calado e atento, comovido e  
risonho  
Escutando verdades e mentira

Mas não dizendo nada

Só a alegria de alguns compreenderem bastará  
Porque tudo aconteceu para que eles comprehendessem  
Que as águas mais turvas contêm às vezes as pérolas mais  
belas

(Acontecimento; Vinícius de Moraes)

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus.**

**Aos meus pais e aos meus irmãos pela educação recebida e confiança em todos os momentos.**

**À EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao CNPq, pela oportunidade de realização deste curso.**

**À Gláucia Soares Barbosa pelo carinho e convivência.**

**À Áurea de Almeida Tatagiba (UFRRJ), pelo trabalho na obtenção dos Espectros de Ressonância Magnética Nuclear.**

**Ao Dr. Silas Varella Fraiz Júnior, pela valiosa cooperação na realização deste trabalho.**

**Aos amigos Carlos Alberto Tuão Gava, Jean Luis Simões de Araújo, Manoel Messias Pereira da Silva, Cláudia Miranda, Rojane Chapeta Peixoto e a todos os meus colegas que comigo iniciaram este curso.**

**Às Dras Maria Cristina Prata Neves e Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação e valiosa contribuição.**

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Severino Matias de Alencar, filho de Ione Matias de Alencar e Maria Advanete dos Santos, nasceu em Salgueiro, Pernambuco, em 17 de julho de 1970.

Graduou-se em Engenharia Agronômica, em agosto de 1994, pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foi bolsista do CNPq, de 1992-1996, atuando na Embrapa-CNPAB.

Em março de 1995, iniciou o curso de Mestrado em Ciência do Solo, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Desde de novembro de 1996, vem exercendo as funções de professor substituto de Bioquímica na UFRRJ.

## **ABREVIATURAS**

- ALN – alantoína
- ALA – ácido alantóico
- GLN – glutamina
- GLU – ácido glutâmico
- ASN – asparagina
- ASP – ácido aspártico
- UREÍDOS – alantoína + ácido alantóico
- CIT – citrulina
- HOM – homosserina
- MeGLN – 4-glutaminametileno
- FBN – fixação biológica de nitrogênio
- YEM – extrato de levedura e manitol
- RMN – ressonância magnética nuclear

## **ÍNDICE**

<b>1. RESUMO GERAL.....</b>	<b>XI</b>
<b>    1.1 GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>XIV</b>
<b>2. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>3. CAPÍTULO I</b>	
<b>    SÍNTESE DE 2,7 <math>^{14}\text{C}</math>-ALANTOÍNA.....</b>	<b>6</b>
<b>        3.1 Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>        3.2 Material e Métodos.....</b>	<b>10</b>
<b>        3.3 Resultados.....</b>	<b>13</b>
<b>        3.4 Discussão.....</b>	<b>17</b>
<b>        3.5 Conclusões.....</b>	<b>19</b>

#### 4. CAPÍTULO II

#### AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS $^{14}\text{C}$ - ALANTOÍNA, $^{14}\text{C}$ -GLUTAMINA, $^{14}\text{C}$ -GLUTAMATO, $^{14}\text{C}$ - ASPARAGINA E $^{14}\text{C}$ -ASPARTATO EM SOJA INOCULADA COM A ESTIRPE BR 33 DE *B. japonicum*.....21

4.1 Introdução.....22

4.2 Material e Métodos.....28

4.3 Resultados.....40

4.4 Discussão.....67

4.5 Conclusões.....74

5 CONCLUSÕES GERAIS.....76

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....78

7 ANEXOS.....87

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espectro de RMN ( $^1\text{H}$ 200 MHz, DMSO), da alantoína sintetizada, com alguns contaminantes após o processo de purificação.....	14
<b>Figura 2:</b> Espectro de RMN ( $^1\text{H}$ 200 MHz, DMSO), da alantoína padrão Sigma.....	14
<b>Figura 3:</b> Espectro de RMN ( $^1\text{H}$ 200 MHz, DMSO), da alantoína sintetizada sem qualquer contaminação.....	15
<b>Figura 4:</b> Espectro de RMN do dietoxiacetato de etila ( $^1\text{H}$ 200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), após um período de 5 meses de armazenamento.....	16
<b>Figura 5:</b> Espectro de RMN do dietoxiacetato de etila ( $^1\text{H}$ 200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), logo após a sua síntese.....	16
<b>Figura 6:</b> Possíveis vias metabólicas para a utilização da ALN em leguminosas produtoras de ureídos.....	27
<b>Figura 7:</b> Aspecto geral das plantas antes da aplicação dos traçadores.....	30
<b>Figura 8 A e B:</b> Aspecto da aplicação dos traçadores através da via fluxo transpiracional.....	32
<b>Figura 9:</b> Autorradiografias das folhas, vagens, grãos e hastes de plantas de soja, em estado reprodutivo, supridas com os traçadores $^{14}\text{C}$ -GLN (A) e $^{14}\text{C}$ -ASN (B).....	42
<b>Figura 10:</b> Autorradiografias das folhas, vagens, grãos e hastes de plantas de soja, em estado reprodutivo, supridas com os traçadores $^{14}\text{C}$ -GLU (A) e $^{14}\text{C}$ -ASP (B).....	43
<b>Figura 11:</b> Autorradiografias das folhas, vagens, grãos e hastes de plantas de soja, em estado reprodutivo, supridas com o traçador $^{14}\text{C}$ -ALN.....	44

<b>Figura 12:</b> Regressão linear entre as leituras obtidas pelo contador de radioisótopos com o inverso da intensidade da cor preta, lidas no programa Corel 4.0 (Corel-Photo), para os traçadores $^{14}\text{C}$ -ALN (A), $^{14}\text{C}$ -GLN (B), $^{14}\text{C}$ -ASP (C), $^{14}\text{C}$ -GLU (D) e $^{14}\text{C}$ -ASN (E).....	47
<b>Figura 13:</b> Porcentagem de $^{14}\text{C}$ recuperada nas folhas de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados (ASN, ASP, GLN, GLU e ALA) via fluxo transpiracional.....	50
<b>Figura 14:</b> Porcentagem de $^{14}\text{C}$ recuperada nas vagens de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados (ASN, ASP, GLN, GLU e ALA) via fluxo transpiracional.....	50
<b>Figura 15:</b> Porcentagem de $^{14}\text{C}$ recuperada nos grãos de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados (ASN, ASP, GLN, GLU e ALA) via fluxo transpiracional.....	51
<b>Figura 16:</b> Distribuição percentual do $^{14}\text{C}$ recuperado nas plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados via de fluxo transpiracional.....	52
<b>Figura 17:</b> Desintegrações por minuto/grama (DPM/g) nas vagens e grãos de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados via fluxo transpiracional (valor médio de 4 repetições).....	53
<b>Figura 18:</b> Porcentagem de $^{14}\text{C}$ recuperada nas folhas, em 4 pontos distintos (1 <sup>a</sup> folha trifoliolada, folha trifoliolada de localização mediana, penúltima folha trifoliolada e última folha trifoliolada), de plantas de soja em fase de enchimento de grão, supridas com $^{14}\text{C}$ -ASN, $^{14}\text{C}$ -ASP, $^{14}\text{C}$ -GLN, GLU e $^{14}\text{C}$ -ALN.....	55
<b>Figura 19:</b> Porcentagem de $^{14}\text{C}/\text{g}$ no tecido das vagens, em 3 idades diferentes, de plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com $^{14}\text{C}$ -ASN, $^{14}\text{C}$ -ASP, $^{14}\text{C}$ -GLN, $^{14}\text{C}$ -GLU e $^{14}\text{C}$ -ALN.....	56

<b>Figura 20:</b> Porcentagem de $^{14}\text{C}/\text{g}$ no tecido dos grãos, em 3 idades diferentes, de plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com $^{14}\text{C}$ -ASN, $^{14}\text{C}$ -ASP, $^{14}\text{C}$ -GLN, $^{14}\text{C}$ -GLU e $^{14}\text{C}$ -ALN.....	56
<b>Figura 21.</b> Desintegrações por minuto/g (DPM/g) em plantas de soja em fase de enchimento de grão, supridas com $^{14}\text{C}$ -ASP, $^{14}\text{C}$ -GLU e $^{14}\text{C}$ -GLN com pulso de 0 e 120 minutos horas.....	58
<b>Figura 22.</b> Desintegrações por minuto/g (DPM/g) em plantas de soja em fase de enchimento de grão, supridas com $^{14}\text{C}$ -ASN e $^{14}\text{C}$ -ALN, com pulso de 0 e 120 minutos horas.....	59
<b>Figura 23:</b> Conteúdo de N-ureído no extrato de folhas de plantas supridas com diferentes pulsos de ALN e água.....	61
<b>Figura 24:</b> Conteúdo de amônia livre no extrato de folhas de plantas supridas com pulsos de ALN e água.....	62
<b>Figura 25:</b> Conteúdo de $\alpha$ -amino livre no extrato de folhas de plantas supridas com diferentes pulsos de ALN e água.....	63
<b>Figura 26:</b> Conteúdo de N-total no extrato de folhas de plantas supridas com diferentes pulsos de ALN e água.....	64
<b>Figura 27:</b> Influência da fonte de nitrogênio no conteúdo de compostos solúveis no extrato de folhas de plantas.....	64
<b>Figura 28:</b> Relação entre decomposição da ALN e a formação de amônia em extratos de folhas de soja, crescidas com nitrato e fixando nitrogênio.....	65
<b>Figura 29:</b> Relação entre o teor de amônia e a formação de aminoácidos, em extratos de folhas de plantas de soja crescidas com nitrato e fixando nitrogênio.....	66

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Compostos nitrogenados presentes na seiva xilemática de plantas fixando nitrogênio.....	23
<b>Tabela 2:</b> Resultados das leituras dos 4 padrões de $^{14}\text{C}$ -prolina pelo contador de radioisótopos.....	45
<b>Tabela 3:</b> Influência do período de pulso (0 e 120 minutos) em plantas de soja em fase de enchimento de grãos (média de todos os traçadores).....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Informações sobre o isótopo $^{14}\text{C}$ para proteção e segurança contra a radiação inonizante.....	87
ANEXO 2: Sumário das análises de variância dos diversos experimentos do capítulo II.....	89
ANEXO 3: Pedido de patente do processo para preparação de Alantoína.....	98

## **1 – RESUMO GERAL**

O nitrogênio é o nutriente mais limitante para o crescimento das plantas, especialmente em sistemas agrícolas. As plantas normalmente adquirem nitrogênio do solo em uma forma inorgânica. Na ausência de um suprimento adequado de nitrogênio do solo, algumas espécies de leguminosas são capazes de formar uma associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas como rizóbio. Através desta simbiose, a planta é capaz de obter parte ou todo o nitrogênio requerido para seu crescimento.

O crescimento e o rendimento de leguminosas produtoras de grãos, dependentes da fixação biológica de nitrogênio, são o resultado da distribuição e utilização dos compostos dependentes das interações entre a planta e a estirpe de rizóbio, provenientes da associação simbiótica. Para a soja, a eficiência da fixação simbiótica tem sido relacionada com a proporção de ureídos na seiva xilemática e a partição destes para os frutos e grãos. Tendo em vista a importância desta cultura para o Brasil, têm-se buscado um melhor entendimento da fisiologia desta cultura, principalmente no que diz respeito a

assimilação, transporte e distribuição dos compostos nitrogenados oriundos da fixação simbiótica.

Visando o estudo de distribuição dos compostos nitrogenados provenientes da associação simbiótica, em um dos períodos mais críticos do ciclo desta cultura, a fase de enchimento de grãos, fez-se uso de compostos nitrogenados enriquecidos com o radiosótopo  $^{14}\text{C}$ . Os compostos  $^{14}\text{C}$ -ASN,  $^{14}\text{C}$ -ASP,  $^{14}\text{C}$ -GLN e  $^{14}\text{C}$ -GLU foram adquiridos comercialmente, enquanto que a  $^{14}\text{C}$ -ALN foi obtida através do enriquecimento por meio de síntese química. Foram feitas modificações do processo de síntese de ALN, a partir da condensação do éster etílico do ácido dicloroacético e uréia, com aumentos significativos do rendimento, o que resultou em um processo passível de patente.

Os compostos nitrogenados enriquecidos com  $^{14}\text{C}$  foram aplicados através da via fluxo transpiracional. As plantas supridas com ALN mostraram uma intensa marcação nas folhas mais novas, com pouca marcação nas folhas mais velhas. A ASN e a GLN apresentaram uma menor intensidade de marcação nas regiões internervais das folhas mais novas e nas folhas mais velhas, quando comparados com aquelas das folhas intermediárias. Este padrão de marcação sugere, assim, que o  $^{14}\text{C}$  não chega em grandes quantidades nas folhas mais novas quando se fornece GLN e ASN.

Os aminoácidos dicarboxílicos ( $^{14}\text{C}$ -GLU e  $^{14}\text{C}$ -ASP) mostraram forte marcação nas folhas mais novas quando comparados com as amidas correspondentes.

Nos frutos em início da formação, a porcentagem de recuperação da ALN, marcada nas vagens das plantas, não diferiu estatisticamente das amidas e aminoácidos, apesar das taxas de transferências, de todos os compostos

nitrogenados, diminuírem com a fase de maturação, assim mesmo, os ureídos mostraram-se superiores, demonstrando sua importância para a nutrição nitrogenada das vagens. A distribuição, dos compostos nitrogenados enriquecidos com  $^{14}\text{C}$ , nos grãos foi semelhante para todos os compostos testados. Os grãos em formação mostraram uma alta porcentagem de recuperação para a amida asparagina, declinando bruscamente com o amadurecimento. Já a ALN, mostrou uma distribuição similar em todas as fases de desenvolvimento dos grãos. Estes resultados corroboram a hipótese de que os ureídos são capazes de manter um adequado suprimento de nitrogênio, necessário ao desenvolvimento das vagens e sementes, resultando em melhores índices de colheita.

## **1.1 - GENERAL ABSTRACT**

Nitrogen is the most limiting nutrient to plant growth, especially in agricultural systems. Plants normally acquire nitrogen from the soil in inorganic form. In the absence of an adequate supply of available soil nitrogen, certain leguminous species are capable of forming a symbiotic association with nitrogen fixing microorganism. Through this symbiosis, the plant is able to obtain part or all of the nitrogen required for plant growth.

Growth and seed yields of grain legumes depending on biological nitrogen fixation are the result of interactions between plant cultivars and rhizobium strains, which affect the intake, distribution, and utilization of nitrogen compounds produced in the nodules. For soybean, biological nitrogen fixation efficiency has been related to ureide contents in xylem sap and, the partitioning of these compounds for pod and seed production. Due to the importance of this crop to Brazil, research efforts have been directed to the comprehensive understand of the physiology of this plant, mainly respect to

the assimilation, transport and distribution of the nitrogenous compounds provenient from the symbiotic fixation.

The study of the distribution of nitrogen compounds exported from the nodules, in one of the most critical periods of the life cycle of this crop that is grains development was achieved by the use of  $^{14}\text{C}$  enriched tracers. The compounds  $^{14}\text{C}$ -ASN,  $^{14}\text{C}$ -ASP,  $^{14}\text{C}$ -GLN and  $^{14}\text{C}$ -GLU were commercially purchased, while  $^{14}\text{C}$ -ALN was obtained through chemical synthesis and labelling. Modifications were made in the process of ALN synthesis, starting from the condensation of the diethoxyacetyl acid ethyl ester and urea. An increase in the yield was observed and the process is possible of patent.

The  $^{14}\text{C}$  labeled nitrogen compounds were applied through the excised shoots of uniform plants. The plants supplied with ALN showed intense high densities of labeling in young leaves, with much less retention in older leaves. The ASN and GLN reaveled less retention of label in interveinal regions of young leaves and old leaves, when compared with middle leaves. This pattern suggests that  $^{14}\text{C}$  do not arrive in any great amounts in the young leaves of the meristematic regions when GLN and ASN are supplied.

The dicarboxylic amino acids ( $^{14}\text{C}$ -GLU and  $^{14}\text{C}$ -ASP) showed heavier labeling in regions of young leaves than their corresponding amides.

During pod development period, the percentage of recovery of ALN in pods walls did not differ statistically of that showed by amides and amino acids, in spite of the rates of transfers. The transference of nitrogenous compounds studied, decreased with pod maturation, even so, the ureides showed a somehow superior rates of transference, demonstrating its importance to the nitrogen nutrition of the pods. The distribution of the nitrogenous compounds labeled with  $^{14}\text{C}$  to the grains was similar for all the

compounds tested. Developing grains showed a percentually higher recovery when asparagine was supplied declining abruptly with the maturation. ALN however showed a homogenous distribution for all the phases of grain development. These results seem to corroborate the hypothesis that ureides are capable of maintaining an appropriate supply of nitrogen, during the development of the pods and seeds, resulting in better harvest indexes than other forms of nitrogenous compounds.

## **2 - INTRODUÇÃO GERAL**

A soja é uma cultura que apresenta grande demanda de nitrogênio (N) devido, particularmente, ao teor protéico elevado dos grãos, de cerca de 40%. A importância da soja como fonte de óleo e proteína, e a sua habilidade de se desenvolver simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio, em solos com baixos teores deste nutriente, dá a esta cultura o “status” da mais valiosa leguminosa produtora de grãos no mundo (Keyser & Fudi Li, 1992). A soja é a cultura anual de maior importância econômica para o Brasil. Responsável por 16,9% da produção mundial (FAO, 1993), o país, em pouco menos de duas décadas, se tornou o segundo maior produtor e exportador mundial desta leguminosa.

Segundo Nishi & Hungria (1996), para um elevado aproveitamento do nitrogênio do ar pela simbiose, é indispensável a inoculação com estirpes de rizóbio de elevada eficiência e competitividade. Embora a seleção de estirpes mais eficientes e competitivas venha sendo realizada desde os primórdios da introdução dessa cultura no Brasil

(Döbereiner *et al.*, 1970), ainda existe grande potencial para incrementar os níveis de produtividade da soja, via fixação biológica de nitrogênio (FBN), pela seleção de estirpes com maior eficiência de conversão do N<sub>2</sub> a amônia (Peres *et al.*, 1984; Neves *et al.*, 1985; Vargas *et al.*, 1992; Hungria *et al.*, 1994).

A amônia é o primeiro produto estável da nitrogenase para as leguminosas estudadas até o momento (Akao, 1991). Após um longo período de controvérsias sobre o papel das enzimas de assimilação de amônia (glutamato desidrogenase, glutamina sintetase e glutamato sintase) (Rawsthorne *et al.*, 1980), foi demonstrado que amônia é excretada dos bacteróides e assimilada diretamente como GLN no citossol das células hospedeiras via glutamina sintetase/glutamato sintase (Ohyama, 1980). Apesar do GLU e da GLN serem os substratos para a assimilação da amônia produzida pela fixação biológica, espécies de leguminosas diferem na composição dos compostos nitrogenados exportados pelos nódulos. Em muitas leguminosas de clima temperado a composição da seiva xilemática é principalmente a ASN, enquanto que para as leguminosas tropicais noduladas os ureídos, constituem, respectivamente, as principais formas de nitrogênio translocadas para a parte aérea (Goi & Neves, 1982; Atkins, 1991). A ASN nas leguminosas de clima temperado está usualmente presente em maior concentração, e a composição da seiva não é alterada significativamente em função da forma de nitrogênio (N<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, amônia ou uréia) utilizada pela planta (Sawazaki, 1986).

Aspectos relacionados com a assimilação, translocação e partição de compostos nitrogenados em leguminosas noduladas, tem sido objeto de numerosos estudos (Thomas *et al.*, 1980; McNeil *et al.*, 1979; Rainbird *et al.*,

1984; Yoneyama, 1984a; Yoneyama, 1984b; Neves *et al.*, 1985; Atkins, 1991; Shelp & Silva, 1990; Rossum *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1996). No caso da soja, existem diferenças significativas na distribuição e metabolismo, dependendo da fonte de nitrogênio utilizada pela planta (Yoneyama, 1984a; Shubert, 1986; Neves & Hungria, 1987). Para esta cultura, o transporte de nitrogênio originado da fixação simbiótica, sob a forma de ureídos, parece alterar a partição do nitrogênio na parte aérea favorecendo a produção de sementes, e de fato, Neves *et al.* (1985) e Hungria *et al.* (1987), comparando o efeito de estirpes de *Bradyrhizobium* em soja, observaram que as bactérias que aumentaram a taxa de transporte de nitrogênio como ureído apresentaram índices de colheita superiores.

Vários autores têm estudado o metabolismo do nitrogênio em leguminosas produtoras de ureídos (Yoneyama, 1984a; Atkins *et al.*, 1982; Atkins, 1991; Shelp & Silva, 1990). Quantidades superiores de ureídos foram encontradas nos órgãos de plantas de soja (exceto semente) associadas a bactérias fixadoras de nitrogênio em comparação com plantas não noduladas e cultivadas com N-mineral (Fujihara *et al.*, 1977). Rainbird *et al.* (1984) demonstraram, por outro lado, que os ureídos não têm um papel direto na nutrição nitrogenada dos grãos. Esses autores concluíram que a GLN, e em seguida, a ASN fornecem a maior parte do nitrogênio para o desenvolvimento da semente em plantas de soja. Peoples *et al.* (1985) também observaram resultados semelhantes em caupi, atribuindo aos ureídos, o papel de fornecedor de nitrogênio para a síntese de aminoácidos supridos inadequadamente para as vagens.

O destino dos vários compostos nitrogenados na parte aérea das plantas depende da seletividade na distribuição lateral, durante o transporte

ascendente pela seiva xilemática (McNeil *et al.*, 1979; Pate, 1980). Em soja, o nitrogênio marcado fornecido na forma de  $^{15}\text{N}$ -GLN e  $^{15}\text{N}$ -ASN, mostrou grande retenção no caule e pecíolos (Yoneyama, 1984a). No estágio de enchimento das vagens houve pouca transformação e retranslocação dessas amidas para os grãos. Com os ureídos, no entanto, observou-se intensa transferência e metabolização, tanto nas folhas jovens, como nas vagens (Yoneyama, 1984b). É interessante notar que quando soluções de  $^{15}\text{N}$ -nitrato,  $^{15}\text{N}$ -ASN ou  $^{15}\text{N}$ -ALN em iguais concentrações foram fornecidas pela via transpiratória para parte aérea de soja, mais nitrogênio foi acumulado nas plantas tratadas com ALN em solução, indicando que o transporte da ALN de alguma forma foi facilitado no conduto xilemático (Yoneyama, 1984a).

Em *Lupinus albus*, utilizando radioisótopos enriquecidos com  $^{14}\text{C}$ , McNeil, *et al.* (1979) relataram um padrão de distribuição bem distinto, onde observaram pequena retenção pelo tecido vascular dos aminoácidos, ASP e GLU que se acumularam nas regiões não vasculares das folhas enquanto que as amidas foram igualmente distribuídas, entre os tecidos vasculares e não vasculares.

Dessa forma, o uso cuidadoso e crítico de radioisótopos e isótopos estáveis se apresenta como uma ferramenta em estudos fisiológicos relacionados com a distribuição e uso de compostos assimilados pela planta. A maioria das substâncias enriquecidas com os diversos isótopos pode ser adquirida comercialmente. Contudo, para alguns casos, a síntese química é a única maneira se obter traçadores específicos. A 2,7- $^{14}\text{C}$ -ALN é um exemplo, onde uma síntese refinada deve ser empregada para que um composto de baixo custo e de elevada pureza seja conseguido. Foram feitas modificações do processo de síntese de ALN, a partir da condensação do éster etílico do

ácido dicloroacético e uréia, com aumentos significativos do rendimento.

A comparação do padrão de distribuição dos ureídos, amidas e aminoácidos, compostos que são exportados pelos nódulos de soja, através do uso de traçadores enriquecidos com  $^{14}\text{C}$ , pode ajudar a esclarecer a razão do melhor aproveitamento do nitrogênio pelas plantas que o utilizam via FBN, resultando em maiores índices de colheita, tal como observado por Neves *et al.* (1985).

### **3 – CAPÍTULO I**

**SÍNTESIS DE 2,7-<sup>14</sup>C-ALANTOÍNA**

### **3.1 – INTRODUÇÃO**

Logo após sua descoberta, os isótopos foram introduzidos nas investigações científicas, entre outros fins, para o estudo da nutrição e da fisiologia das plantas. O uso de traçadores tem facilitado os estudos sobre a distribuição de substâncias e, principalmente, a elucidação de vias metabólicas. Tais estudos dependem, porém, da disponibilidade do isótopo estável apropriado, bem como, serem possíveis os métodos de aplicação, separação e detecção. Usos particulares têm sido feitos com isótopos enriquecidos com  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ , e  $^{35}\text{S}$ , os quais possuem uma meia vida relativamente longa, baixa energia e são emissores de partículas beta. Em virtude do carbono ser o principal átomo na estrutura dos compostos orgânicos, a maioria dos estudos com traçadores em bioquímica e fisiologia vegetal envolvem substâncias enriquecidas com  $^{14}\text{C}$ . De qualquer maneira, nas investigações que envolvem a distribuição de compostos orgânicos de baixo peso molecular, normalmente, é requerida a marcação do isótopo em átomos

de carbono específicos, para que seja possível o acompanhamento dessas substâncias. Freqüentemente, quando compostos contendo isótopos radioativos não são disponíveis, usa-se da alternativa de síntese. A 2,7-<sup>14</sup>C-ALN é um bom exemplo, visto que esse traçador não é comercializado.

A ALN (5-ureidoidantoína) é produto da condensação química de duas moléculas de uréia com uma molécula de um ácido orgânico. Ela está estreitamente relacionada com muitas substâncias nitrogenadas complexas que existem em animais e plantas (Miall e Miall, 1953). Nos microrganismos, a degradação dos ureídos produz uma variedade de fontes de nitrogênio para o ambiente externo. Em mamíferos, à exceção do homem e primatas, é o produto final do metabolismo das purinas, resultando da oxidação do ácido úrico (Conn e Stumpf, 1990).

A alantoína tem despertado um grande interesse das indústrias de cosméticos, da área biomédica e de fisiologistas vegetais. Esse derivado da uréia apresenta interessantes propriedades cicatrizantes e anti-sépticas, motivo pelo qual vem sendo adicionado a cosméticos e remédios (Hawley, 1975 & The Merck Index, 1985). A alantoína, também forma complexos que são farmaceuticamente ativos na terapia e profilaxia do câncer. A importância desse composto para os fisiologistas vegetais se deve, principalmente, ao fato de que várias plantas da família das leguminosas associadas a bactérias fixadoras de nitrogênio, que reduzem o N<sub>2</sub> a amônia nas raízes, exportam o nitrogênio para a parte aérea, principalmente nesta forma (Atkins, 1991).

Alguns métodos de síntese de ALN encontram-se descritos na literatura, porém apresentam limitações devidas ao seu alto custo de produção, como, por exemplo, a síntese a partir da oxidação do ácido úrico, ou baixos rendimentos, como no caso da condensação do ácido glioxílico (Hartman *et*

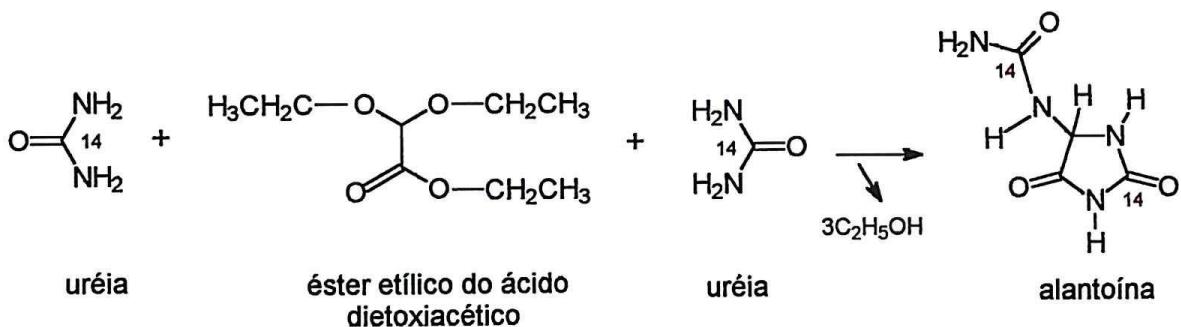
*al.*, 1943). Dessa forma, estudos fisiológicos e bioquímicos que necessitem desse composto enriquecido com  $^{14}\text{C}$  ficam comprometidos.

Zellner & Stevens (1939) patentearam um método para a síntese de ALN, entretanto ela apresenta um rendimento de no máximo 45%, o que ainda pode ser considerado baixo, quando do seu uso para obtenção do composto marcado 2,7- $^{14}\text{C}$ -ALN.

Este trabalho apresenta um melhoramento na metodologia de Zellner & Stevens (1939), que resultou em um processo que é mais rápido, prático e de maior eficiência para a obtenção da ALN, para aplicação em qualquer dos usos em que este composto possa ser usado, dentre os quais, estudos de fisiologia vegetal.

### **3.2 - MATERIAL E MÉTODOS**

Foi adquirida a patente americana para a síntese direta da alantoína, através da reação de um mol do éster etílico do ácido dietoxiacético com dois moles de uréia, de acordo com a equação abaixo (Zellner & Stevens, 1939).

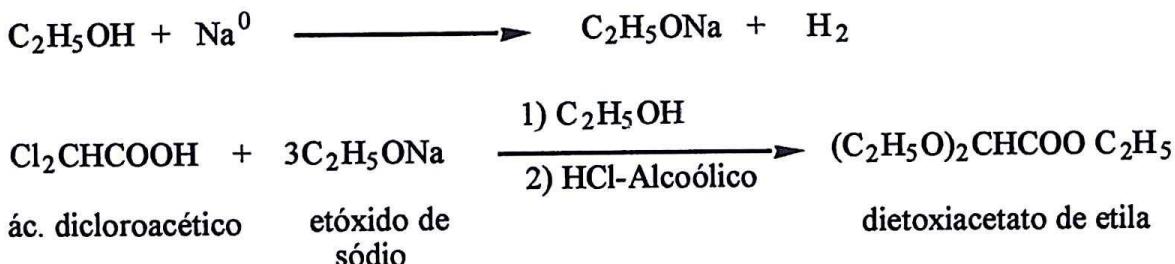


#### **Preparação do dietoxiacetato de etila**

Em um balão de fundo redondo de dois litros, equipado com condensador de refluxo, foram adicionados 400 ml de etanol seco. Em seguida, 32g (1,4 mol) de Na<sup>º</sup> foram acrescentados rapidamente, para que se

dissolvesse sem a necessidade de aquecimento. Subseqüentemente, juntou-se, gota a gota, à solução ainda quente, 34 ml (0,4 mol) de ácido dicloroacético durante um período de no máximo 15 minutos. O balão foi mantido durante 3 horas, sob refluxo, com agitação, mantendo-se o banho a uma temperatura de 90°C. Ao final da reação, o balão foi resfriado rapidamente, e à solução fortemente agitada, adicionou-se suficiente solução HCl-alcóolica de forma a persistir uma sobra de 0,2 mol de HCl. Foram utilizados 125 ml de solução HCl-alcóolica (6,5 N). A solução permaneceu, então, 24 horas a temperatura ambiente, sendo, após esse tempo, neutralizada com etóxido de sódio (somente foram neutralizados os 0,2 moles de HCl que ficaram em excesso). Todo NaCl foi separado por filtração a vácuo. O óleo obtido da filtração foi extraído num funil de separação, utilizando-se água e éter na proporção 1:1, até serem obtidas duas camadas claramente visíveis. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída novamente com éter etílico. As frações orgânicas foram, então, secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, e o éter evaporado em um evaporador rotatório. Após a evaporação do éter, obteve-se 28 g do dietoxiacetato de etila.

A série de reações envolvidas na preparação do éster do dietoxiacetato de etila, pode ser ilustrada da seguinte forma:



A alantoína, enriquecida com  $^{14}\text{C}$ , foi obtida utilizando os reagentes na ordem como descrita abaixo:

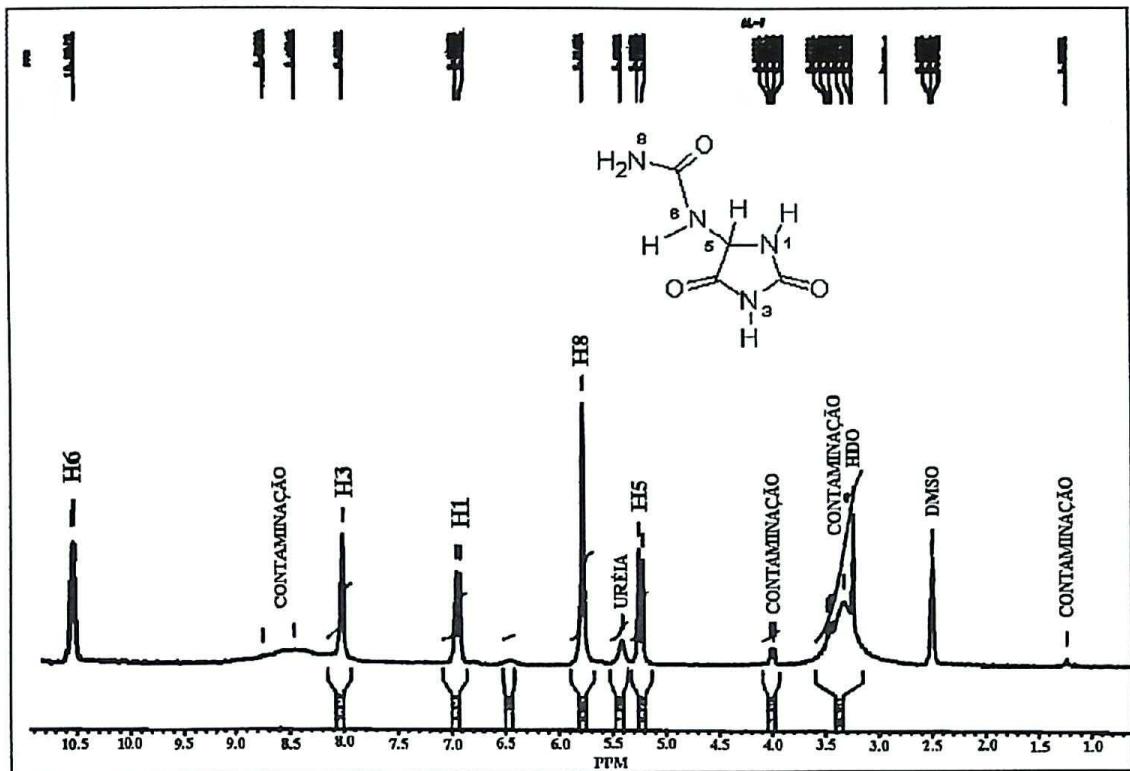
<u>Reagentes empregados</u>	<u>Quantidades</u>
- dietoxiacetato de etila	9,5 mmoles
- uréia	25,0 mmoles
- $^{14}\text{C}$ -uréia	0,1 mmol (50 $\mu\text{Ci}$ )
- Etoxietanol	1,5 ml (98%)
- HCl	0,9 ml (37%)

Os reagentes acima foram aquecidos sob refluxo em um balão de fundo redondo de 250 ml em um banho de óleo a 110º C por 10 horas. Depois do período de refluxo, o balão foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com porções de 1,0 ml de água, depois por 1,0 ml de álcool e, finalmente, por 1 ml de éter. O rendimento foi de 0,8 gramas, com uma atividade radioativa de 15  $\mu\text{Ci}$ .

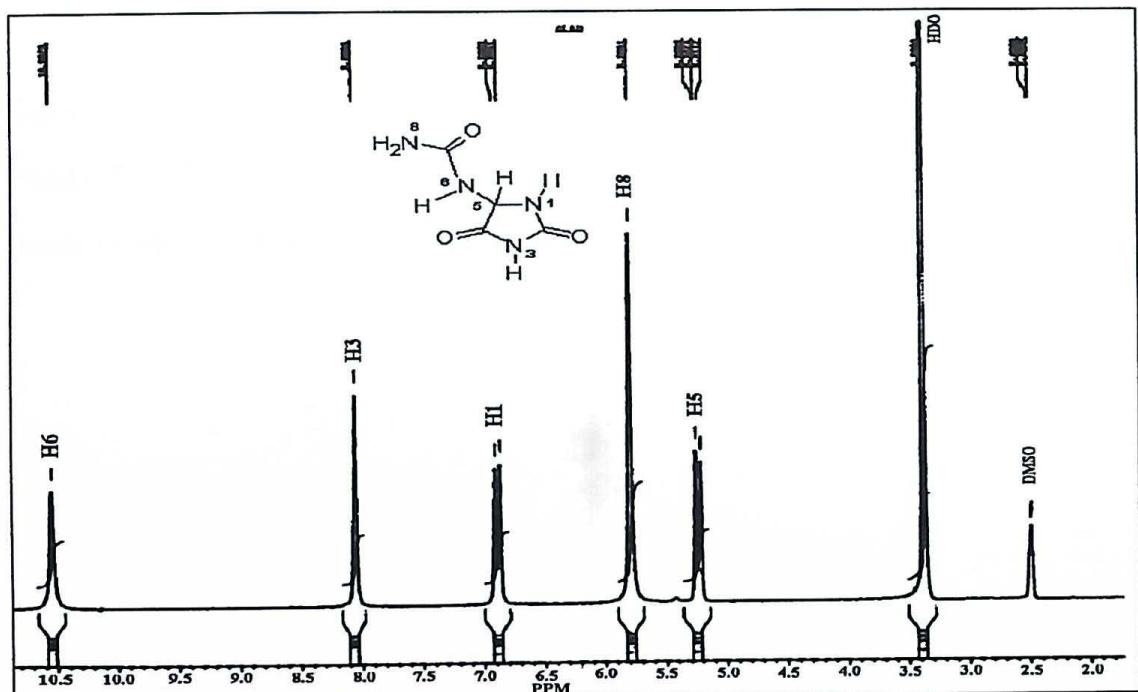
### **3.3 - RESULTADOS**

A alantoína foi sintetizada, em uma única etapa, através da condensação direta da uréia com o dietoxiacetato de etila (composto dissustituído do ácido acético). O tempo de condensação foi reduzido em 10 horas, e a permanência em banho de gelo por 24 horas, como descrito na patente, após o término da reação, foi eliminada.

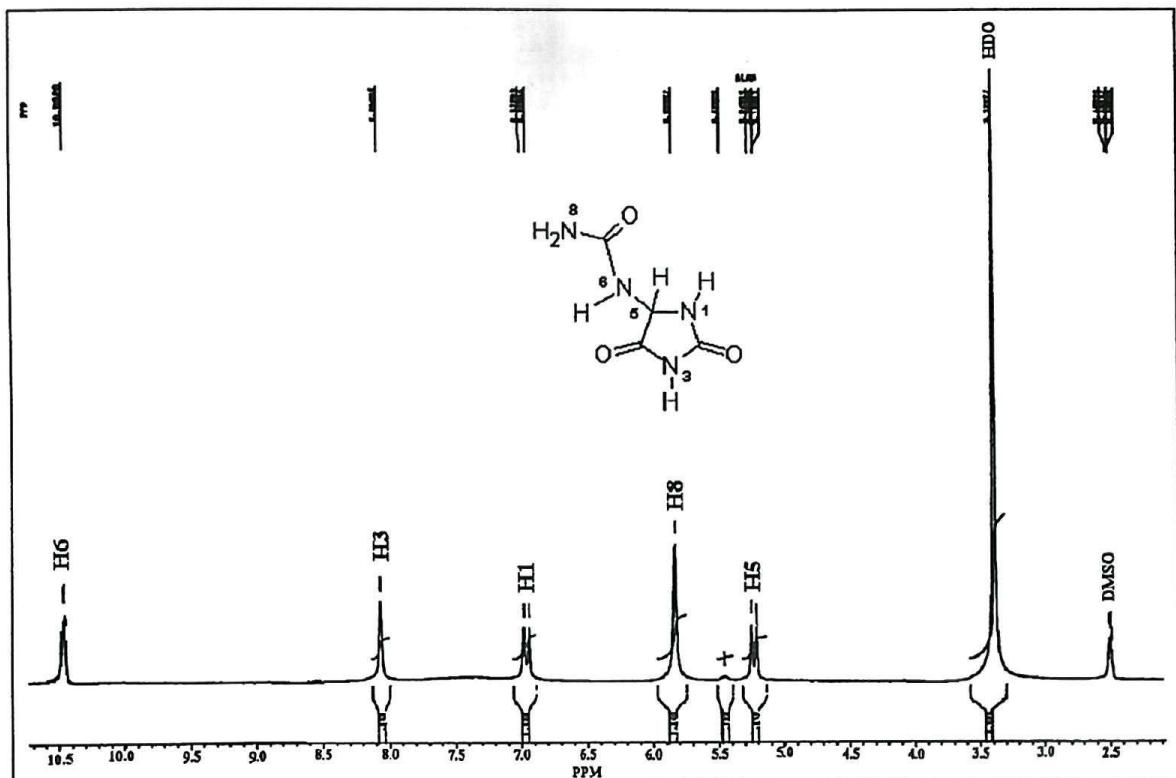
Os primeiros resultados positivos ainda mostraram alguma contaminação (Figura 1), quando comparados com o espectro de RMN padrão (Figura 2). Já os últimos ensaios mostraram que a alantoína obtida pela síntese é tão pura quanto a vendida comercialmente (Figura 3), o que possibilitou a sua marcação com uréia enriquecida com  $^{14}\text{C}$ .



**Figura 1:** Espectro de RMN ( $^1\text{H}$  200 MHz, DMSO), da alantoína sintetizada, com alguns contaminantes após o processo de purificação.

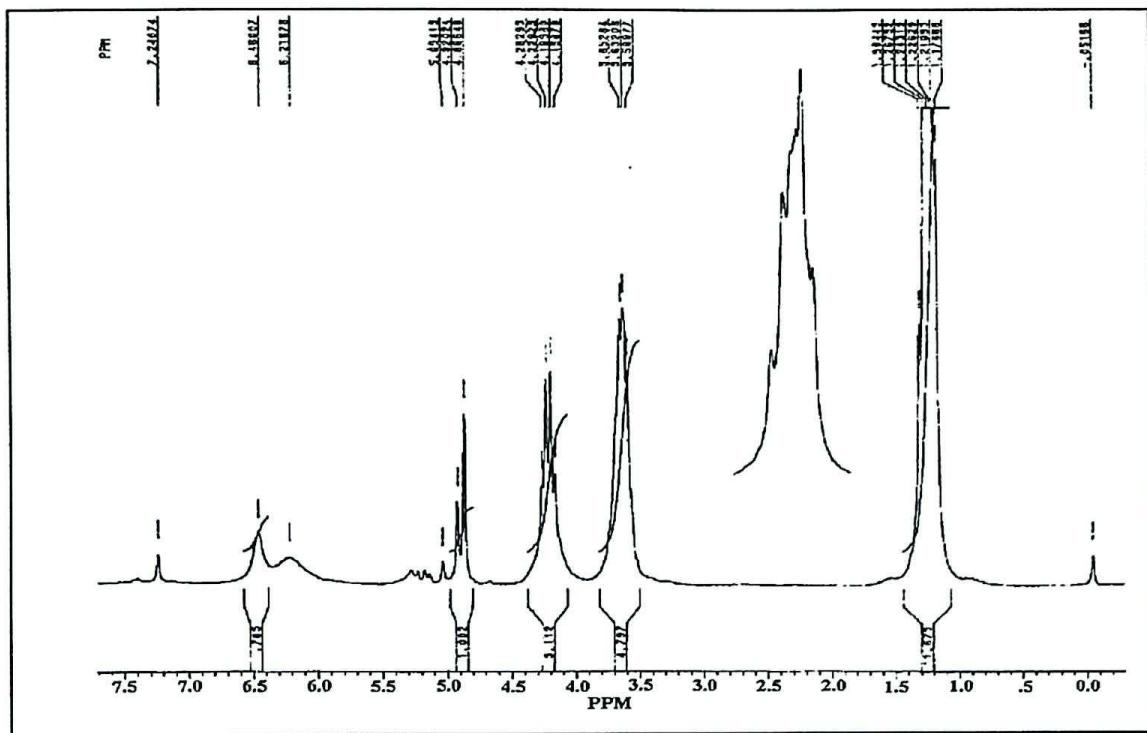


**Figura 2:** Espectro de RMN ( $^1\text{H}$  200 MHz, DMSO) da alantoína padrão Sigma.

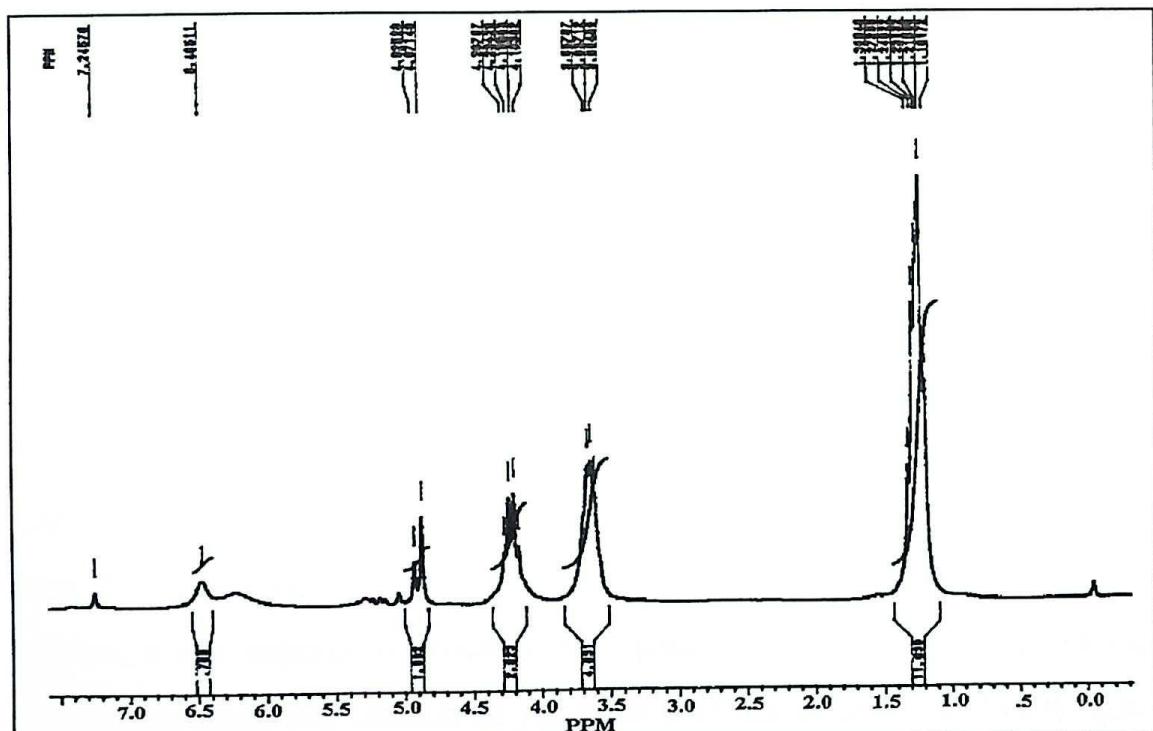


**Figura 3:** Espectro de RMN ( $^1\text{H}$  200 MHz, DMSO) da alantoína sintetizada sem qualquer contaminação.

O espectro de RMN do dietoxiacetato de etila, quando armazenado durante o período observado, 5 meses (Figura 4), mostrou que os efeitos de oxidação não afetaram sua estrutura química, comparando-se com o espectro deste composto logo após a sua síntese (Figura 5).



**Figura 4:** Espectro de RMN do dietoxiacetato de etila ( $^1\text{H}$  200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), após um período de 5 meses de armazenamento.



**Figura 5:** Espectro de RMN do dietoxiacetato de etila ( $^1\text{H}$  200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), logo após a sua síntese.

### **3.4 – DISCUSSÃO**

A síntese de alantoína, a partir dos métodos descritos por Zellner & Stevens (1939), mostrou-se inviável ou com baixos rendimentos. A condensação direta da uréia com ácido dicloroacético não produziu o resultado desejado. A síntese a partir de um mol dietoxiacetato de etila com dois moles de uréia apresentou rendimentos pouco satisfatórios, o que levou a modificações na presente metodologia.

A síntese do dietoxiacetato de etila foi simplificada e a sua eficiência melhorada, em comparação com a metodologia original descrita por Wohl & Lange (1908). A relação molar uréia/dietoxiacetato de etila diminuiu de 3,9 para 2,6, e o rendimento em alantoína foi acima de 65%, em relação ao teórico, o que superou o processo com patente registrada junto ao serviço de patentes dos Estados Unidos da América (Zellner & Stevens, 1939), que é de 45%. O tempo de condensação foi reduzido em 10 horas, e eliminou-se a

permanência em banho de gelo dos produtos por 24 horas, após o término da reação. A temperatura de condensação foi também reduzida em 10° Celsius. Essas modificações, além de facilitarem o trabalho de manuseio dos radioisótopos, proporcionaram uma redução no custo energético desta síntese.

A inovação da técnica de síntese da alantoína mostrou-se de bom êxito, o que pode ser comprovado, comparando-se o espectro da alantoína padrão (figura 2) com o espectro da alantoína obtida pela síntese (figura 3), quando ambos possuem a mesma identidade para esse composto. Este processo de preparação da alantoína em uma única etapa apresenta o aspecto positivo de não ser necessário o isolamento de compostos intermediários, como é o caso do método proposto por Hartman *et al.* (1943).

Esta mudança na técnica de obtenção da alantoína, quando comparada com outros métodos, apresenta vantagens, como o melhor rendimento (o rendimento da alantoína obtida a partir do ácido glioxílico é menor que 30%) custo mais baixo, em comparação com o método em que se usa o ácido úrico oxidado em solução alcalina com permanganato de potássio (Hartman *et al.*, 1943). O uso desse processo possibilita o enriquecimento da alantoína com uma maior eficiência, tanto com  $^{14}\text{C}$  quanto com  $^{15}\text{N}$ , necessários a diversos estudos bioquímicos e fisiológicos.

### **3.5 - CONCLUSÕES**

- As modificações na metodologia de obtenção do etil éster do ácido dietoxiacético proporcionaram uma forma mais fácil de preparação deste composto, além de um aumento significativo no seu rendimento.
- A estabilidade do dietoxiacetato de etila possibilitou a produção desta substância em uma escala maior do que a necessária, tornando possível o armazenamento para posterior uso, o que reduz, os custos de produção.
- As modificações na forma de condensação do dietoxiacetato de etila com uréia (redução da quantidade de solvente e do agente condensante ácido clorídrico) proporcionaram uma redução nos custos de síntese da alantoína, pois essas duas substâncias são as que mais oneram este processo, quando da produção deste composto em uma escala maior.

- As inovações na síntese química da alantoína produziram um composto com alto grau de pureza. As possíveis contaminações, pelo menos ao nível de análises de ressonância magnética nuclear (RMN), foram negligenciáveis.
- O aumento de eficiência na síntese da alantoína (de 45 para 65% do total teoricamente possível) possibilitou, então, o enriquecimento deste composto com uma maior taxa de incorporação de  $^{14}\text{C}$  proveniente da uréia, reduzindo, dessa forma, os resíduos radioativos que, direta e indiretamente, elevam o custo final de produção.

## **4 – CAPÍTULO II**

**4 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DA DISTRIBUIÇÃO DOS COMPOSTOS NITROGENADOS  $^{14}\text{C}$ -ALN,  $^{14}\text{C}$ -GLN,  $^{14}\text{C}$ -GLU,  $^{14}\text{C}$ -ASN E  $^{14}\text{C}$ -ASP EM SOJA INOCULADA COM A ESTIRPE BR 33 DE *B. japonicum***

#### **4.1 - INTRODUÇÃO**

A forma pela qual o nitrogênio é transportado do local de assimilação nas raízes para a parte aérea das plantas tem sido amplamente estudada em uma grande variedade de plantas. Nitrato, aminoácidos, amidas e ureídos tem sido reconhecidos como as principais formas de nitrogênio presentes na seiva xilemática da maioria das plantas cultivadas (Mosquim & Sodek, 1992).

Em soja, o nitrogênio proveniente da fixação biológica é rapidamente transportado dos nódulos pela seiva xilemática (Neves & Hungria, 1987), apesar da concentração de nitrogênio no tecido nodular ser maior do que no tecido radicular. O nitrogênio presente nos nódulos pode representar até 20% do nitrogênio total acumulado pela planta, dependendo da fase de desenvolvimento (Neves, 1981).

Apesar do GLU e da GLN serem os compostos aminados primários da fixação de nitrogênio atmosférico, as espécies de leguminosas apresentam diferenças na composição da seiva xilemática (Shubert, 1986). A maioria das

leguminosas associadas a bactérias, que fixam o nitrogênio simbioticamente, podem ser classificadas em exportadoras de amidas e exportadoras de ureídos, baseando-se na composição da seiva xilemática. As exportadoras de amidas transportam principalmente ASN, GLN ou MeGLN, enquanto as exportadoras de ureídos transportam ALN, ácido alantóico ALA ou CIT (Tabela 1). Apesar desses compostos serem os de maior proporção encontrados no xilema de plantas que fixam nitrogênio simbioticamente, quantidades de outros aminoácidos protéicos e não-protéicos estão também presentes. Baixos níveis de ALN e ALA ocorrem na seiva xilemática de leguminosas exportadoras de amidas, enquanto que as amidas estão normalmente presentes na seiva de leguminosas tropicais. A quantidade absoluta e a proporção relativa, desses solutos nitrogenados, varia com o desenvolvimento e fatores ambientais (Schubert, 1986; Pate, 1989; Atkins, 1991; Santos *et al.*, 1996).

**Tabela 1:** Compostos nitrogenados presentes na seiva xilemática de plantas fixando nitrogênio.

Espécie de planta	Principais compostos nitrogenados
<i>Arachis hypogaea</i>	ASN, ALN, ALA
<i>Vicia faba</i>	ASN, GLN
<i>Vicia ervilia</i>	ASN, GLN
<i>Pisum sativum</i>	ASN, GLN, HOM, ASP
<i>Lupinus albus</i>	ASN, GLN
<i>Vigna unguiculata</i>	ALN, ALA
<i>Vigna mungo</i>	ALN, ALA
<i>Vigna radiata</i>	ALN, ALA
<i>Phaseolus vulgaris</i>	ALN, ALA
<i>Glycine max</i>	ALN, ALA, ASN
<i>Alnus rubra</i>	CIT
<i>Albizia lophantha</i>	4-MeGLN

Fonte: Shubert (1986); Neves & Hungria (1987).

A presença de ALN e ALA na seiva xilemática de leguminosas tropicais é um indicativo da fixação de N<sub>2</sub> dentro de um número de espécies (Peoples *et al.*, 1989; Herridge & Peoples, 1990; Atkins, 1991), mas os ureídos também são encontrados, independentemente da FBN, servindo como compostos de estoque em leguminosas tropicais e em outras espécies, e já foram detectados na seiva xilemática de plântulas e plantas não fixando N<sub>2</sub>, supridas ou estressadas por nitrogênio mineral (Goi & Neves, 1987) e em menor quantidade, na seiva de leguminosas exportadoras de amidas (McNeil & La Rue, 1984; Pate, 1989; Schubert, 1986; Yoneyama & Kondo, 1990). Nestes casos, os ureídos resultaram da oxidação das purinas, possivelmente, formados durante a degradação de ácidos nucleicos nos cotilédones, raízes ou tecidos senescentes.

Comparando plantas de soja cultivadas sob condições de FBN com outras supridas exclusivamente com nitrogênio mineral na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, vários autores têm encontrado diferenças marcantes na composição dos compostos nitrogenados presentes no exudado xilemático (Yoneyama *et al.*, 1985). Em soja, os ureídos, alantoína e ácido alantóico, são as principais formas de nitrogênio transportadas pela via xilemática quando a planta cresce totalmente dependente da FBN (Atkins, 1991). Nestas condições, Shelp & Silva (1990), mostraram que os ureídos representam a maior fonte de nitrogênio para a parte aérea da soja durante o período vegetativo. Os principais sítios de acúmulo de ureídos em soja são ramos, pecíolos e pontos de crescimento (Pate *et al.*, 1980; Thomas *et al.*, 1980), xilema dos tecidos dos ramos e paredes de vagens em desenvolvimento, sendo baixa a concentração de ureídos nas sementes e folhas (Yoneyama & Ishizuka, 1982).

Os ureídos são as formas mais eficientes de transporte de nitrogênio, tanto em relação ao uso de carbono como em relação ao custo energético de síntese (Schubert, 1986; Neves & Hungria, 1987). O aumento da produção e transporte de ureídos em espécies de plantas onde o carbono possa ser um fator limitante, é consistente com a teoria de que os ureídos são as mais eficientes formas de transporte de nitrogênio. As leguminosas produtoras de ureídos são reconhecidamente mais econômicas no uso de fotoassimilados quando comparadas com as exportadoras de amidas. Cálculos feitos para caupi demonstraram ser necessários o uso de 5,4g C por g de N fixado enquanto para *Lupinus* sp. são necessários 6,9g C por g de N fixado. Estas diferenças de eficiência não podem ser atribuídas arbitrariamente pelas diferenças entre o custo de produção de ureídos ou amidas. Muitos outros fatores, como diferenças nas taxas de evolução de H<sub>2</sub>, reciclagem de H<sub>2</sub>, PEP carboxilase, podem contribuir para este aumento na eficiência (Shubert, 1986).

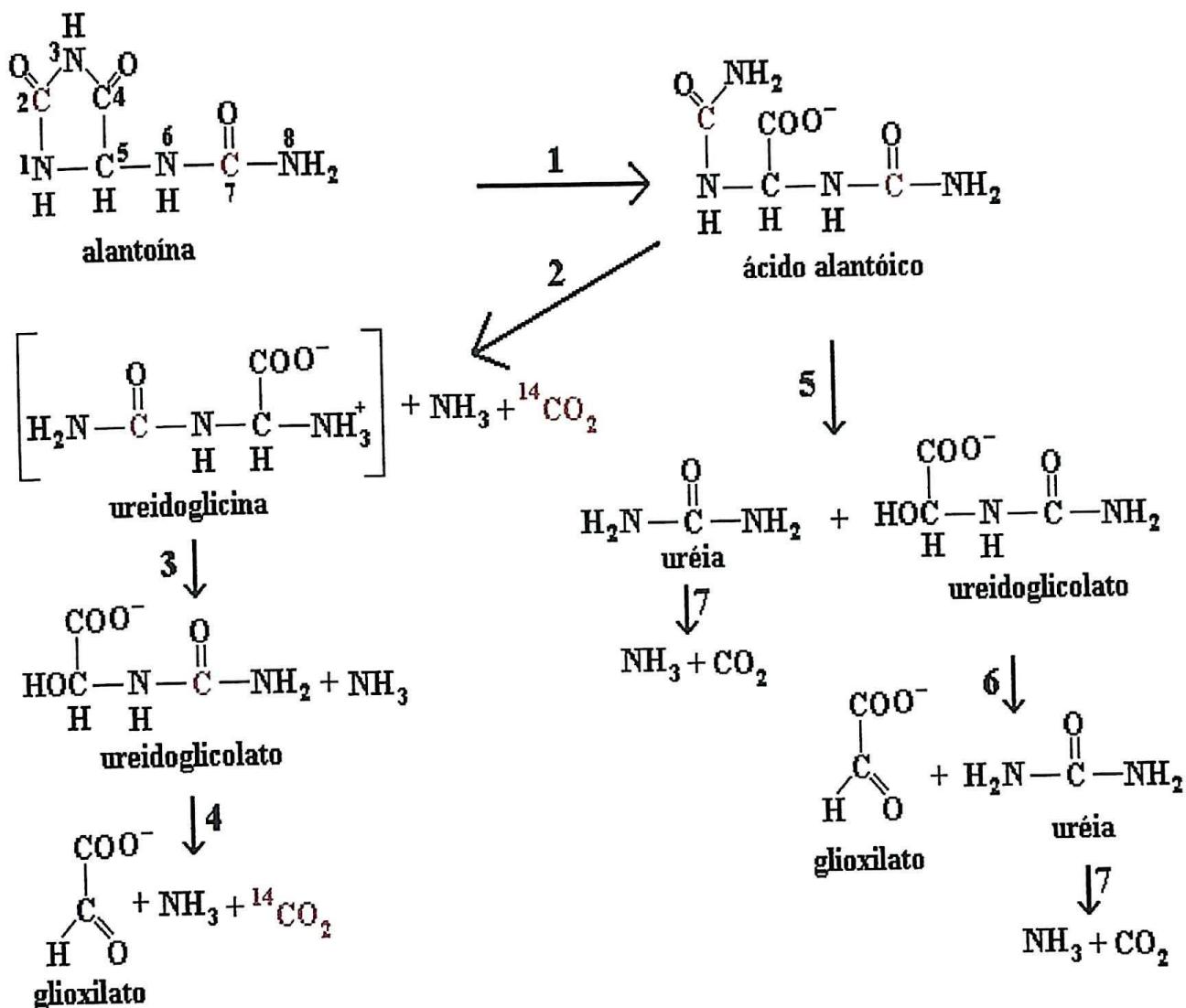
O metabolismo e a utilização de ureídos ainda não estão bem esclarecidos. Há concordância, porém de que ALN é catabolizada diretamente para amônia e CO<sub>2</sub> sem o envolvimento de uréia como intermediário (Winkler *et al.*, 1987; Winkler *et al.*, 1988; Stebbins & Polacco, 1995) (Figura 6).

Estudos comparativos da distribuição de nitrogênio em plantas de soja associadas com bactérias fixadoras de nitrogênio e N-mineral, por Ohyama (1983) mostraram que as folhas não são necessariamente a principal fonte de nitrogênio para os frutos quando o nitrogênio provém da fixação biológica, ao contrário do que acontece com plantas supridas com nitrato. Yoneyama & Ishizuka (1982), mostraram que o nitrogênio proveniente da FBN após a floração é utilizado preferencialmente para o crescimento das regiões reprodutivas, sendo que os ureídos parecem ser metabolizados mais

intensamente do que as amidas na casca da vagem de soja (Mosquim & Sodek, 1992). Altos teores de ureídos foram encontrados nas vagens de soja, principalmente no período de enchimento dos grãos (Gomes & Sodek, 1984). Peoples *et al.* (1985) mostraram que os ureídos são fornecidos para as vagens de caupi por via xilemática, enquanto que as amidas são transportadas, principalmente, por via floemática. Rainbird *et al.* (1984) observaram que, embora os ureídos representem a maior fração do nitrogênio transportado na seiva xilemática eles não desempenham o papel principal na nutrição do embrião, sendo a GLN e a ASN as principais fontes de nitrogênio usadas pelo embrião de soja para a síntese protéica. Considerando os ureídos como a principal fonte de nitrogênio para a vagem na fase inicial de seu desenvolvimento, pode-se admitir o seu papel, nesta fase, como fornecedor de nitrogênio para a síntese de aminoácidos essenciais ao crescimento dos grãos. Neves & Hungria (1987), observaram que os compostos nitrogenados provenientes do sistema radicular não são distribuídos uniformemente entre os órgãos da parte aérea. O efeito da estirpe de rizóbio pode afetar o transporte de nitrogênio como observado em soja (Neves *et al.*, 1985) e feijão (Hungria & Neves., 1987), onde os teores de ureídos na seiva xilemática foram relacionados com o melhor desempenho da bactéria, correlacionando inclusive, positivamente com a presença do sistema hidrogenase.

Muitos autores têm sugerido considerável especificidade na maneira pela qual os compostos nitrogenados provenientes dos nódulos são utilizados e distribuídos na parte aérea, principalmente, na fase reprodutiva (Pate, 1980; Thomas & Schrader, 1981). Alguns são prontamente transferidos do xilema para o floema, outros são absorvidos a partir do xilema para serem estocados na parte aérea. Este trabalho teve como objetivo examinar a distribuição nas

folhas, vagens e grãos dos compostos nitrogenados exportados pelos nódulos de soja, assim como avaliar, quantitativamente sua distribuição, utilizando radioisótopos enriquecidos com  $^{14}\text{C}$ .



**Figura 6:** Possíveis vias metabólicas para a utilização da ALN em leguminosas produtoras de ureídos. (1) alantoinase; (2) alantoato amidohidrolase; (3) ureidoglicina amidohidrolase; (4) ureidoglicolato amidohidrolase; (5) alantoicase; (6) ureidoglicolase; (7) urease. Adaptado de Shelp & Ireland (1985); Winkler *et al.*, (1987) e Winkler *et al.*, (1988).

## **4.2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **Experimento I**

#### ***Material vegetal***

O experimento foi realizado em uma câmara de crescimento na EMBRAPA-CNPAB, Seropédica, RJ, no período de dezembro de 1995 à maio de 1996.

Utilizou-se plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merril), cultivar Doko, crescidas em vasos de Leonard modificados (Vincent, 1970) contendo areia e vermiculita na proporção 2:1 (v:v), previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por uma hora.

Em cada vaso, foram semeadas quatro sementes previamente esterilizadas com  $HgCl_2$ , 0,2% (Vincent, 1970) e, posteriormente, inoculadas colocando-se 1 ml de inoculante (cerca de  $10^8$  células.ml<sup>-1</sup>) por plântula, 7 dias após a emergência (7 DAE). A estirpe BR 33 de *Bradyrhizobium japonicum* usada como inoculante foi crescida em meio YEM (Vincent, 1970)

à 29°C por 8 dias, com agitação. O desbaste foi realizado por ocasião da inoculação (7 DAE), deixando-se somente uma planta por vaso. Como a cultivar estudada é adaptada a dias curtos foi feita um complemento do período de iluminação diário objetivando a indução da floração no período adequado do desenvolvimento. Inicialmente, durante um mês a partir da germinação, forneceu-se 13 horas de luz (luz de comprimento de onda na faixa do azul e vermelho) diária, após esse período as plantas foram expostas, durante 10 dias, a 8 horas de luz diária para a indução da floração.

Forneceu-se às plantas, semanalmente, solução nutritiva sem adição de nitrogênio (Norris & T'Mannetje, 1964 modificado), contendo: KCl (2,0 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,7 mM), CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (2,0 mM), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2,0 mM), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,3 µM), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,7 µM), MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,0 µM), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,002 µM), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (11,5 µM), Fe-EDTA (0,095 mM) e ácido cítrico (0,03 mM). As plantas usadas no experimento estavam bem noduladas e no período reprodutivo, em fase de enchimento de grãos. A figura 7 ilustra o aspecto geral das plantas antes da aplicação dos traçadores.



Figura 7: Aspecto geral das plantas antes da aplicação dos traçadores.

#### *Preparação do material vegetal*

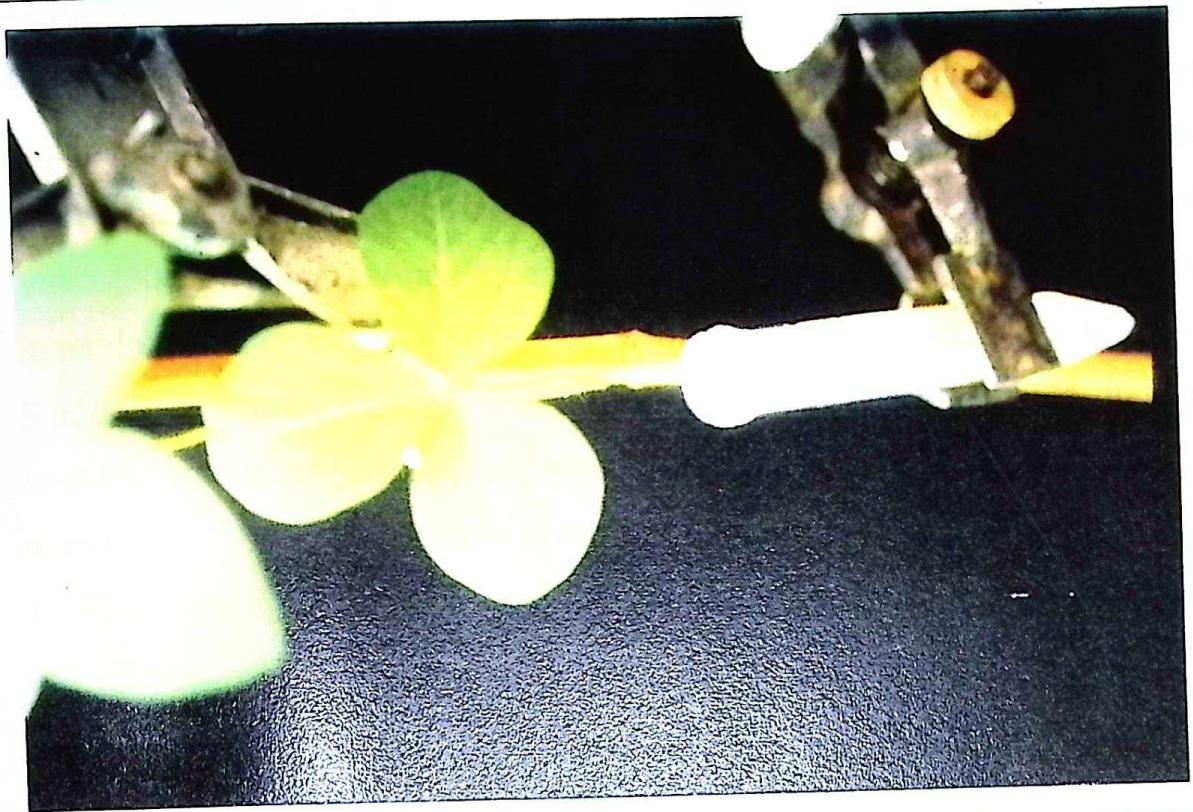
Antes da aplicação dos traçadores, plantas selecionadas e padronizadas quanto ao tamanho e número de nós, foram colocadas dentro de uma câmara fechada e com ambiente controlado. Em seguida, foram decapitadas na altura do nó cotiledonar, enquanto a porção basal da haste era mantida imersa na água destilada, para evitar se evitar interromper o fluxo do xilema. O ambiente da câmara foi mantido durante todo o período de crescimento e de tratamento a 30°C, 65%UR e  $350\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz fotossinteticamente ativa ao nível das folhas unifolioladas. O ar do interior foi coletado em uma solução de NaOH (10N), de modo a garantir que uma possível liberação de  $^{14}\text{CO}_2$  fosse retida na forma carbonato de sódio ( $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ ).

### *Aplicação dos compostos nitrogenados enriquecidos com $^{14}C$*

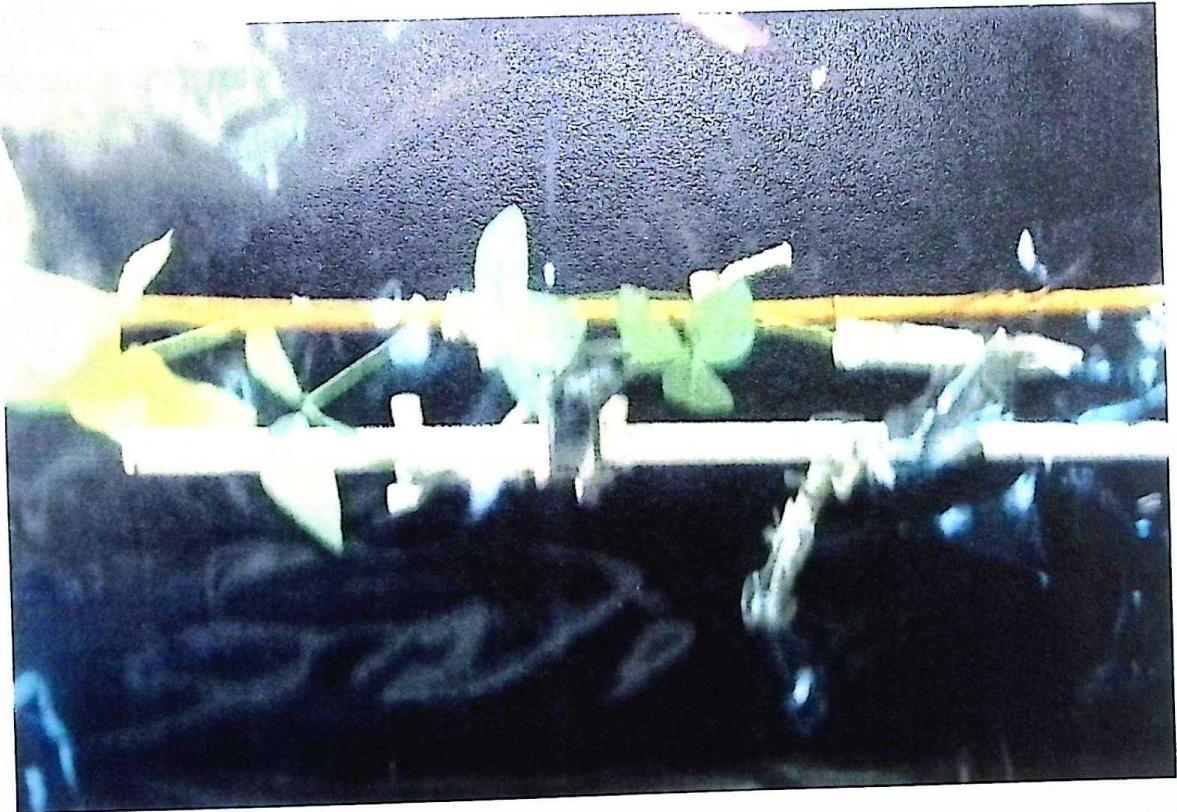
Os radioisótopos, L-[U- $^{14}C$ ]GLN (9,99 GBq/mmol), L-[U- $^{14}C$ ]GLU (10,0 GBq/mmol), L-[U- $^{14}C$ ]ASN (8,44 GBq/mmol) e L-[U- $^{14}C$ ]ASP (8,14 GBq/mmol), foram adquiridos comercialmente, enquanto que a 2,7- $^{14}C$ -ALN (0,1 GBq/mmol) foi sintetizada conforme discutido no capítulo I. Os traçadores foram aplicados na concentração de 10mM (simulando as concentrações dos solutos nitrogenados na seiva xilemática), preparados na solução nutritiva usada para o cultivo. Cada parte aérea absorveu 5ml da solução marcada, via fluxo transpiracional (Figura 8 A e B), contendo  $56,2 \times 10^3$  Bq (1,5  $\mu$ Ci), com exceção das plantas tratadas com alantoína que receberam apenas  $6,4 \times 10^3$  Bq (0,17  $\mu$ Ci). Após a absorção completa dos radioisótopos foi aplicado um período de “pulso” (chase), de 2 horas, com soluções (10mM) não marcadas, correspondente aos respectivos traçadores aplicados. O período de pulso teve como objetivo verificar se havia uma melhor distribuição dos radioisótopos aplicados, tanto, para os órgãos vegetativos quanto reprodutivos.

Figura 8 A e B: Aspecto da aplicação dos traçadores através da via fluxo transpiracional.

B



A

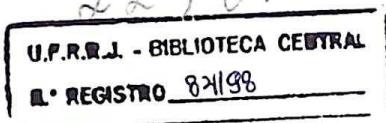


## *Autorradiografias*

Após a aplicação dos traçadores, as plantas foram imediatamente separadas em folhas, hastes, vagens e grãos, sendo então prensadas, juntamente com uma dupla camada de papel absorvente, por duas peças de vidro (30cm x 30cm). Após a completa secagem durante 15 dias, o material mantido em uma estufa à 50°C, foi aberto e exposto a um filme de raio-X Kodak X-Omat. Os filmes permaneceram em exposição, durante 35 dias, em uma câmara escura. Subseqüentemente, as autorradiografias foram reveladas usando-se o D19 auto contraste como revelador, seguido por uma lavagem de 1 minuto com água, e imersas 3 minutos no fixador e reforçador 3000 Kodak.

## *Análise da distribuição do $^{14}\text{C}$ nas partes da planta*

Após a obtenção das autorradiografias, o material foi separado para a determinação do peso. Alíquotas de 120 mg de folhas, hastes, vagens ou grãos foram transferidas para frascos de digestão, contendo 0,2 ml de  $\text{HClO}_4$  (70%) e 0,2 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). O material foi incubado durante 4 horas a uma temperatura de 70°C (Mahin & Lofberg, 1966 modificado). Em seguida, adicionou-se 5 $\mu\text{L}$  da amostra digerida a um filtro de cintilação “HCT Dot” e o  $^{14}\text{C}$  incorporado aos tecidos, foi medido em um contador sólido para radioisótopos (Quick Count QC-4000/XER, com 3 canais). Devido este contador não utilizar nenhum tipo de líquido cintilante não apresenta, assim, problemas com os vários tipos de “quenching” (extinção das leituras) existentes, principalmente quando se trata de material vegetal. Sendo assim, qualquer substância marcada com  $^{14}\text{C}$ , desde que se conheça a DPM (desintegrações por minuto) real, pode ser usada como padrão primário. Foi



usado como padrão a L-[U-<sup>14</sup>C]prolina  $9,4 \times 10^3$  Bq (0,25 µCi) da marca Amersham, com uma atividade específica de 9,77 Mbq/mmol.

### ***Tratamento de imagens***

As autoradiografias foram escaneadas com equipamento scanner de mesa AGFA (modelo Horizont Plus), com 200 ppi (pixels per inch) de definição, configurado para escanear objeto transparente em uma escala de cinzas (256 tonalidades). O software utilizado para escanear foi o controlador Horizont Plus, apropriado para o modelo do equipamento utilizado. Em seguida, as autoradiografias, foram processadas no programa Corel 4.00 (Corel Photo) para aprimoramento da cor (brilho, contraste e intensidade). Após isso, realizou-se leituras da intensidade da cor preta e correlacionou-se com amostras determinadas pelo contador de radioisótopos. O Corel Photo apresenta uma escala de leitura de intensidade de cores que varia de 0 (preto) a 255 (branco).

### ***Tratamento estatístico***

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado: 5 tratamentos (<sup>14</sup>C-ALN, <sup>14</sup>C-ASP, <sup>14</sup>C-ASN, <sup>14</sup>C-GLU e <sup>14</sup>C-GLN) x 2 pulsos (0 e 120 minutos de pulso) x 2 repetições. Os dados foram analisados pelo programa Mstat-C (Mstat-C, 1988) para a determinação da análise de variância. Como não houve nenhuma interação do período de pulso com os tratamentos analisou-se separadamente cada fator passando, assim, o número de repetições dos tratamentos para 4 e o número de repetições do período de

pulso para 10. A separação entre as médias dos tratamentos foi conduzida usando-se o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%. No caso da identificação de heterocedastia, os dados foram transformados, através da aplicação da raiz quadrada, antes da análise da variância.

## **Experimento II**

*Análise dos compostos nitrogenados em extratos da parte aérea de plantas de soja, após o fornecimento em diferentes tempos de alantoína e água.*

### ***Material vegetal***

As plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merril cv. "Doko" foram cultivadas em vasos de Leonard modificados (Vincent, 1970) dentro de casa de vegetação em condições naturais de luz e temperatura entre os meses de janeiro e fevereiro. A esterilização e inoculação das sementes, assim como o desbaste, foi feito como o descrito no experimento I. Após a expansão das folhas cotiledonares, além da suprimento de água, sempre que necessário, forneceu-se, semanalmente, solução nutritiva com as mesmas concentrações mencionadas no experimento I. De acordo com o tratamento, as plantas foram inoculadas ou então supridas com nitrogênio mineral na forma de  $\text{KNO}_3$  (70 mg N.pl<sup>-1</sup> semanalmente). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso: 2 fontes de N ( $\text{NO}_3^-$  e fixação biológica) x 2 tratamentos (ALN e água) x 4 tempos de tratamentos (0, 1, 2 e 4 horas) x 3 repetições.

## *Preparação do material vegetal*

Antes do fornecimento de ALN ou água via fluxo transpiracional, as plantas foram decapitadas na altura do nó cotiledonar, enquanto a porção basal da haste era mantida imersa em água destilada, para se evitar interromper o fluxo do xilema. As substâncias utilizadas nos tratamentos, alantoína (10 mM) e água, foram aplicados na solução nutritiva usada para o cultivo.

## *Preparo do Extrato de Folhas.*

A extração do material para as análises dos compostos nitrogenados solúveis efetuou-se de acordo com a metodologia de Magalhães *et al.* (1992). Logo após destacadas da parte aérea, as folhas foram picadas e colocadas em frascos de 100 ml com metanol, na proporção de 1g de material para 10 ml de metanol. Após 48 horas foi adicionado aos frascos 5ml de clorofórmio e 6 ml de água, o qual foi agitado então vagarosamente. A porção aquosa (água-metanol), contendo os ureídos solúveis, aminoácidos livres, amônia e outras moléculas foi separada através do uso de uma pipeta “Pasteur”, da porção solvente (clorofórmio) contendo clorofila e lipídios.

## *Análises*

### **Aminoácidos livres**

Os aminoácidos livres foram dosados de acordo com Yemm e Cocking (1955), por reação colorimétrica com a ninidrina, baseada na produção estequiométrica quantitativa da dioxohidrindilidena-dioxohidrindamina

(DYDA), pigmento de cor púrpura. A ninidrina apresenta reação com todos aminoácidos que apresentam um grupamento  $\alpha$ -amino livre, produzindo um pigmento púrpura. No caso dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina, em que o grupamento  $\alpha$ -amino é substituído, o derivado produzido tem cor amarela.

Para análise do extrato foliar, usaram-se alíquotas de 1 ml da porção aquosa contendo os aminoácidos livres. De acordo com o método, em um tubo de ensaio com tampa rosqueável, foi colocado 1 ml de solução de amostra, adicionado de 0,5 ml de tampão citrato, pH 5,0 (0,2 M), 0,2 ml de ninidrina 5% em etileno glicol monometil éter e 1,0 ml de cianeto de potássio (2% v/v KCN 0,01M em etileno glicol monometil éter). Os tubos foram rosqueados e aquecidos à 100°C por 20 minutos. Em seguida foram resfriados e completados a 4,0 ml com etanol (60%), e a leitura realizada a 570 nm no período máximo de 1 hora. O ensaio em branco foi preparado pela mesma marcha analítica, contendo água em vez de amostra. O mesmo procedimento foi realizado para as alíquotas das soluções padrão de leucina, nas quais as concentrações variaram de 0,1 a 0,5 mM.

## Ureídos

Os ureídos foram dosados de acordo com Vogels & Van der Drift (1970), por método colorimétrico que estima a reação do derivado da hidrazina com o ferricianeto de potássio ( $K_3FeCN_6$ ). O derivado da hidrazina é formado pela hidrólise ácida do ácido alantóico em uréia e ácido glioxílico. A alantoína, outro ureído, é transformada em ácido alantóico por uma hidrólise básica.

A amostra do extrato do foliar (250 µl) foi colocada em um tubo de ensaio, adicionando-se em seguida água suficiente par completar a 0,75 ml. Após isso acrescentou-se 0,25 ml de NaOH (0,5 N) e aqueceu-se a 100°C por 8 minutos (hidrólise básica). Resfriou-se em gelo, adicionando-se 0,25 ml de HCl (0,65 N) e aqueceu-se por 4 minutos a 100°C (hidrólise ácida). Após resfriamento em gelo, adicionou-se 0,25 ml de tampão fosfato (0,4 M, pH 7,0) e 0,25 ml de fenilhidrazina ( $C_6H_5NH.NH_2$ ) a 0,33%. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 minutos e então colocados em água gelada para desenvolvimento da coloração, através da adição de 1,25 ml de HCl concentrado, pré-resfriado, seguido por 0,25 ml de ferricianeto de potássio ( $K_3FeCN_6$ ) a 1,65 N. Os tubos foram, então, removidos do gelo e após 10 minutos leu-se a absorbância em 535 nm. As leitura foram realizadas entre 20 a 30 minutos do término da reação. O mesmo procedimento foi realizado para o ensaio em branco e para as alíquotas da solução padrão de alantoína onde as concentrações variaram de 17 nmoles.ml<sup>-1</sup> a 167 nmoles.ml<sup>-1</sup>.

## Amônia

A amônia foi analisada pela formação do composto azul-de-indofenol. Foi usado o método de Mitchell (1972) modificado, onde a solução de hipoclorito de sódio foi substituída por dicloroisocianurato de sódio (Felker, 1977) pois, sob condições tropicais, a solução de hipoclorito de sódio perde rapidamente seu poder oxidante. À amostra do extrato metanólico (40 µl), adicionou-se água destilada até completar 0,5 ml. Adicionou-se, então, 2,5 ml

da solução “A” e 2,5 ml da solução “B”. A mistura foi agitada e após 30 minutos, leu-se a absorbância em 630 nm.

O reagente “A” é constituído da solução contendo de 5g de fenol e 25 mg de nitroprussiato de sódio em 500 ml de água destilada, e o reagente “B”, de 15,0 g de NaOH e 0,31 de dicloroisocianurato de sódio em 500 ml de água. A curva padrão foi realizada utilizando-se uma solução de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), onde as concentrações variaram de 0,1  $\mu\text{moles.ml}^{-1}$  a 1 $\mu\text{moles.ml}^{-1}$ .

### N-Total solúvel

Foi usado o método de Bohley (1967) para análise do N-total. Colocou-se, em um tubo de ensaio, 150 ml do extrato e 100  $\mu\text{l}$  da mistura de digestão de Kjeldahl. Em seguida, os tubos foram colocados num bloco digestor à 150°C, para evaporar o excesso de água, por aproximadamente 60 minutos. Aumentou-se então a temperatura para 300°C por 120 minutos. Os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e, então, adicionou-se 0,5 ml de água destilada. Procedeu-se, então, como para as análises de amônia.

A mistura digestora para Kjeldahl consistiu de 203,2 g de sulfato de sódio hexahidratado ( $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), 230 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e 5,4 g de  $\text{HgCl}_2$  dissolvidos para 1 litro de água destilada. A curva padrão foi feita a partir de uma solução padrão de alantoína (0.040g/100 ml). O número de  $\mu\text{moles}$  adicionado por tubo variou de 2,1 a 10,6.

## **4.3 - RESULTADOS**

### **Experimento I**

*Localização autorradiográfica do  $^{14}\text{C}$  suprido como  $^{14}\text{C-ALN}$ ,  $^{14}\text{C-GLN}$ ,  $^{14}\text{C-GLU}$ ,  $^{14}\text{C-ASN}$  e  $^{14}\text{C-ASP}$ , por via xilemática, através de fluxo transpiratório*

Os radioisótopos aplicados promoveram a marcação de todos os tecidos. As nervuras e hastes sempre apresentaram as maiores densidades de marcação. Estes padrões de distribuição foram estabelecidos com aplicação dos compostos nitrogenados marcados (0,17 a 1,5  $\mu\text{Ci}$ ), via fluxo transpiracional, seguidos ou não por aplicação de um pulso, com o mesmo composto não marcado, no período de tempo de 120 minutos. O suprimento dos compostos nitrogenados enriquecidos com  $^{14}\text{C}$  na forma de GLN e ASN, mostraram altas densidades de marcação nas hastes e nervuras das folhas. Uma menor

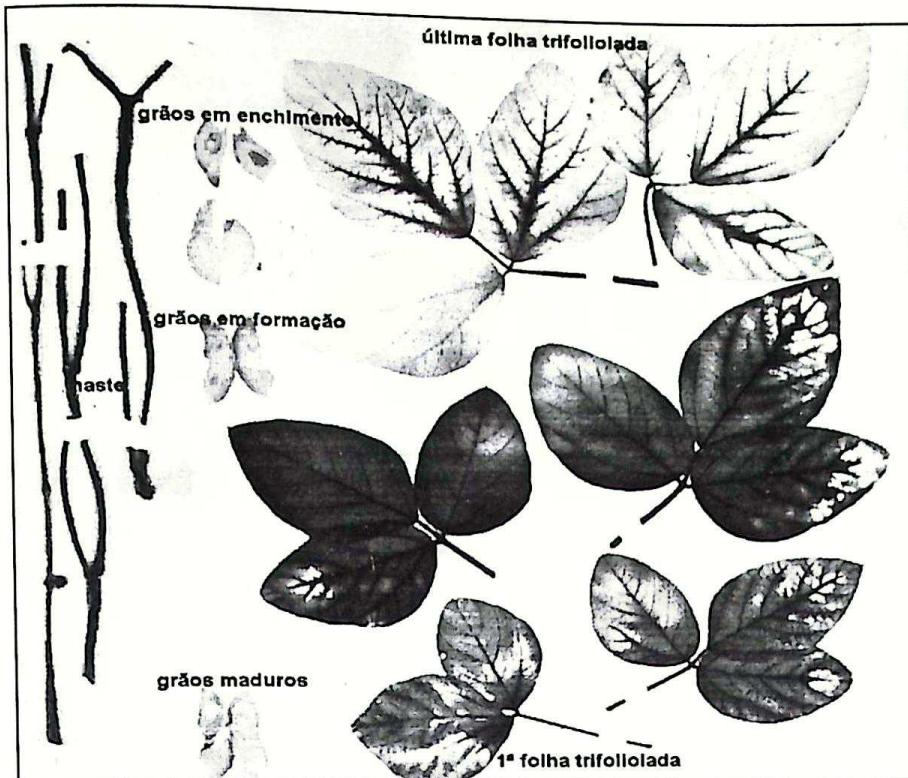
intensidade nas regiões internervais das folhas mais novas e mais velhas quando comparado com aquele das folhas intermediárias foi também observada (Figura 9A e B). Este padrão de marcação sugere que o  $^{14}\text{C}$  não chega em grandes quantidades nas folhas mais novas e velhas quando se fornece GLN e ASN.

Os aminoácidos dicarboxílicos ( $^{14}\text{C-GLU}$  e  $^{14}\text{C-ASP}$ ) mostraram uma forte marcação nas folhas mais novas (Figura 10A e B), quando comparado com as amidas correspondentes.

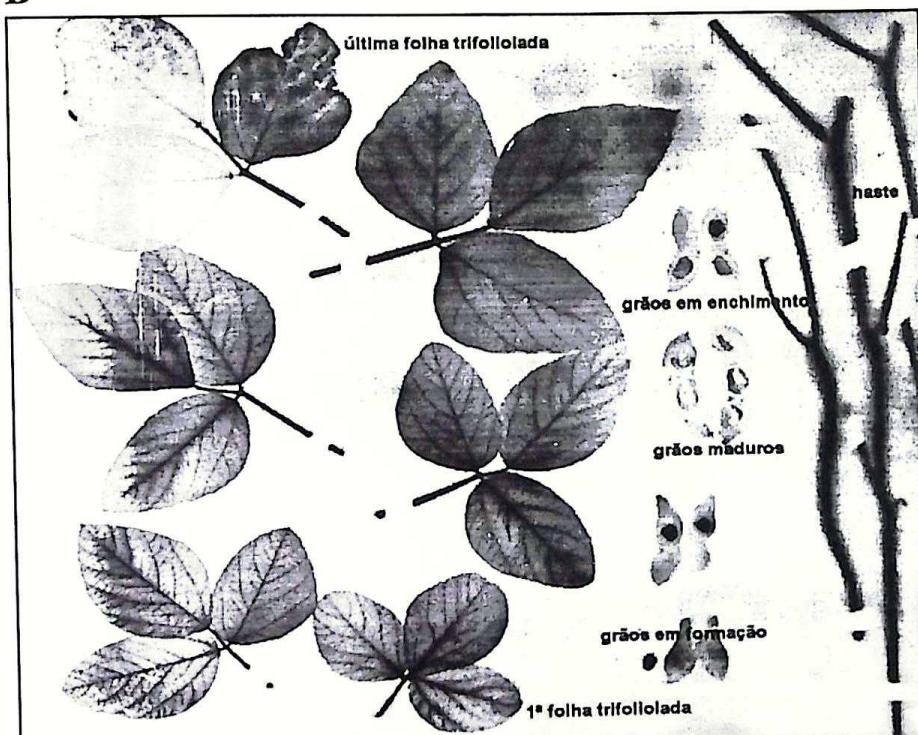
A ALN mostrou uma distribuição do  $^{14}\text{C}$  que privilegiou as folhas mais novas, ao passo que nas folhas mais velhas, pouca ou nenhuma marcação foi observada, exceto na região das nervuras (Figura 11). A ALN apresentou um padrão de distribuição mais semelhante ao do GLU e ASP do que da GLN e ASN.

O padrão de distribuição do  $^{14}\text{C}$  nos frutos, para todos os aminoácidos e amidas correspondentes, mostraram uma alta marcação nos grãos e menor nas vagens. O contrário foi encontrado para a ALN, onde uma alta retenção foi observada para as vagens e pouca marcação foi visualizada nos grãos (Figuras 9A,B; 10A,B e 11).

A

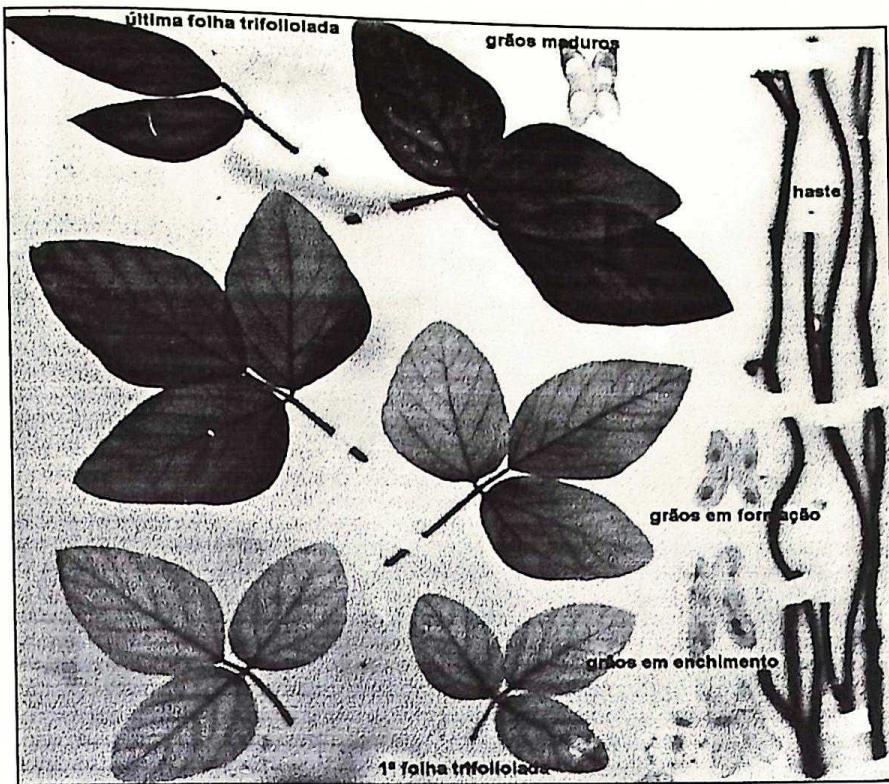


B

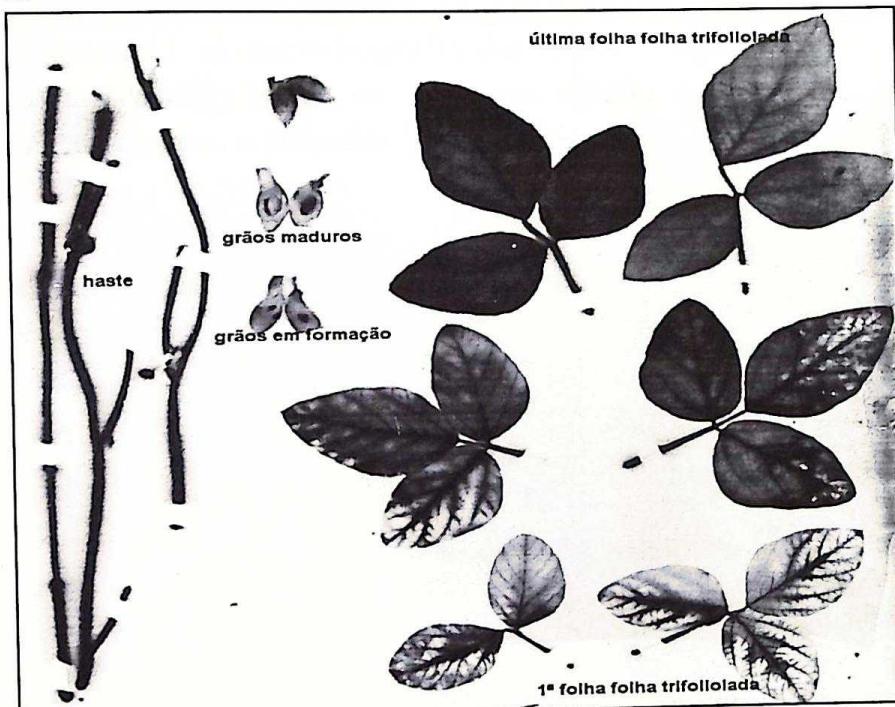


**Figura 9:** Autoradiografias das folhas, vagens, grãos e hastes de plantas de soja, em estado reprodutivo, supridas com os traçadores  $^{14}\text{C}$ -GLN (A) e  $^{14}\text{C}$ -ASN (B).

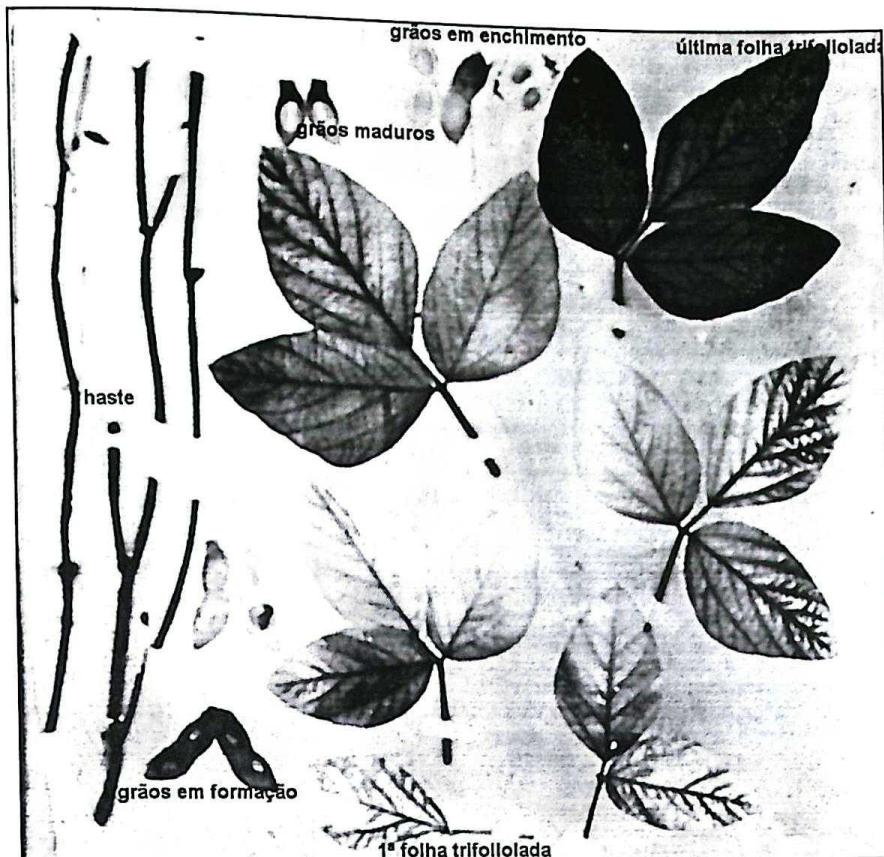
A



B



**Figura 10:** Autoradiografias das folhas, vagens, grãos e hastes de plantas de soja, em estado reprodutivo, supridas com os traçadores  $^{14}\text{C}$ -GLU(A) e  $^{14}\text{C}$ -ASP (B).



**Figura 11:** Autoradiografia das folhas, vagens, grãos e hastes de plantas de soja, em estado reprodutivo, supridas com o traçador  $^{14}\text{C}$ -ALN.

### *Curva de calibração do contador de radioisótopos*

A curva de calibração para o contador foi feita utilizando-se amostras, de  $^{14}\text{C}$ -prolina, de DPM conhecidas. Esta verificação na calibração mostrou que a curva linear numa faixa bastante ampla como observado na tabela 2.

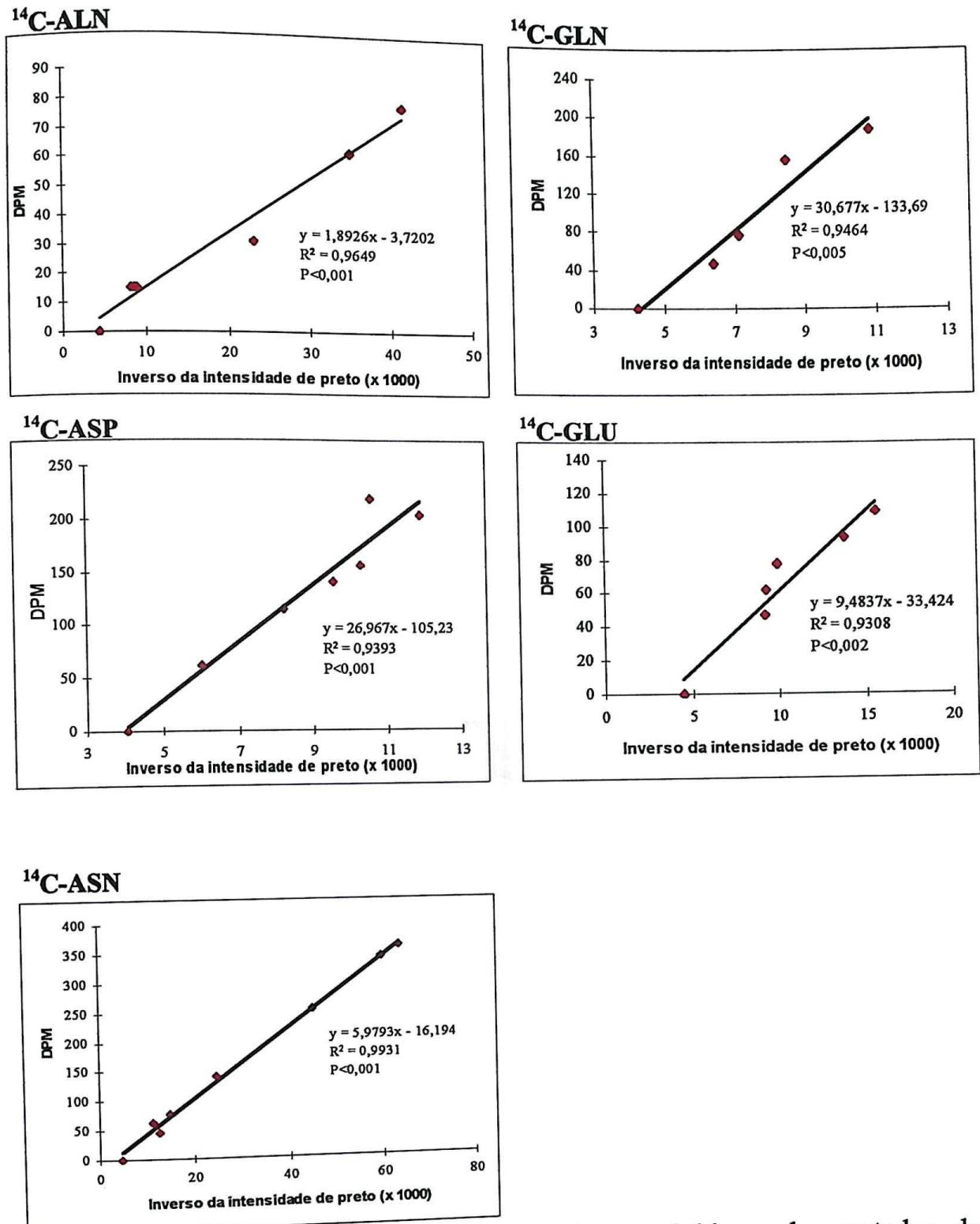
**Tabela 2:** Resultados das leituras dos 4 padrões de  $^{14}\text{C}$ -prolina pelo contador de radioisótopos.

Padrões de $^{14}\text{C}$ -prolina (DPM)	Contagem das amostras (DPM) (média de três repetições)
50	40
250	227
500	409
1000	954

### *Análise das Imagens*

A obtenção das leituras de cores, das autoradiografias escaneadas, foi feita utilizando-se o programa Corel 4.0 (Corel-Photo). O filtro equalizador de cores deste programa, permite a determinação de intensidade da cor preta e branca, as quais são plotadas em um histograma, com uma escala que varia de 0 (preto) a 255 (branco). Para que os maiores valores numéricos correspondessem às maiores intensidades da cor preta, facilitando a interpretação dos resultados, os dados foram transformadas através da inversão das leituras obtidas, pela fórmula: intensidade de preto = 1/leitura x 1000. Nas figuras, 12A, B, C, D e E, estão mostradas as correlações entre DPM e o

inverso de intensidade da cor preta para cada autorradiografia, uma vez que existem variações entre elas decorrente do processo de revelação, principalmente, em relação ao “background” e ao contraste entre as diferentes áreas. As análises de  $^{14}\text{C}$  nas diversas partes das plantas, realizadas pelo contador de radioisótopos mostraram uma regressão linear, positiva e significante pelo teste F, quando correlacionou-se DPM com o inverso da intensidade da cor preta.



**Figura 12:** Regressão linear entre as leituras obtidas pelo contador de radioisótopos com o inverso da intensidade da cor preta, lidas no programa Corel 4.0 (Corel-Photo) para os traçadores utilizados.

## *Distribuição na parte aérea do $^{14}\text{C}$ suprido como alantoína e compostos aminados*

De um modo geral a ALN foi mais rapidamente recuperada nos tecidos observados, mostrando que os ureídos são mais facilmente distribuídos do que os outros compostos, que provavelmente ficaram retidos nas hastes. Ao se analisar isoladamente o efeito do período de pulso sobre cada tecido, pode-se observar que o tratamento de 120 minutos, na maioria dos casos, mostrou sempre os maiores valores absolutos, quando comparado com as leituras obtidas sem o período de pulso (Tabela 3). No entanto, não foi observada interação em nenhum dos parâmetros avaliados com o período de pulso.

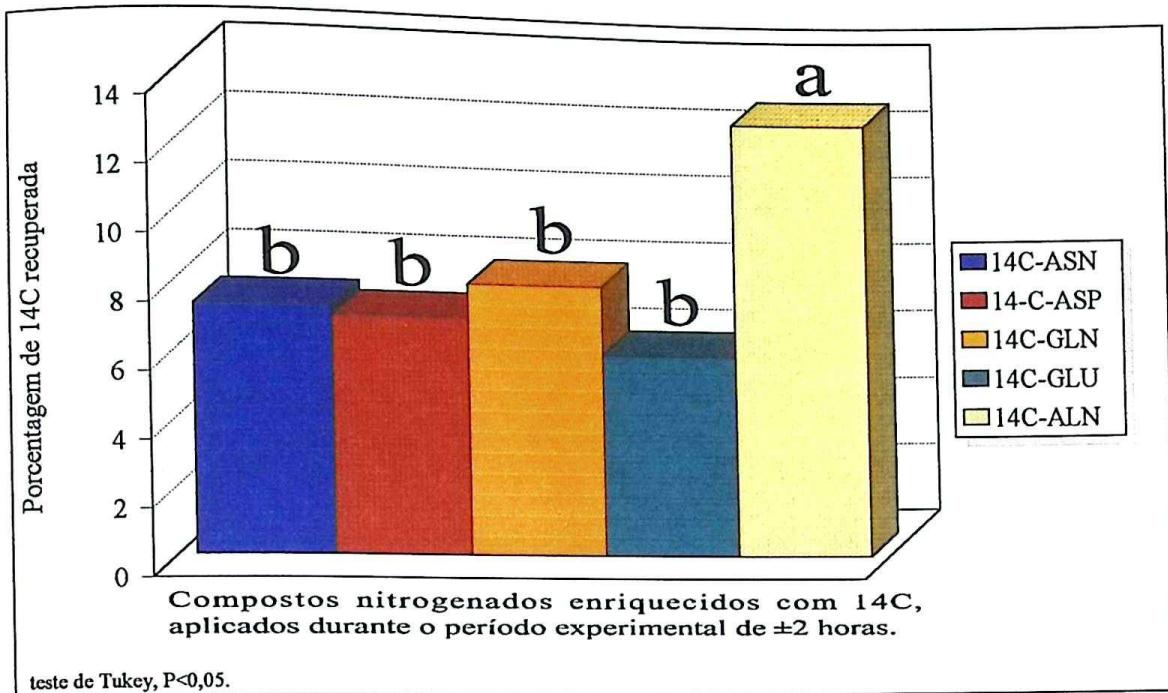
A distribuição percentual dos compostos nitrogenados recuperados pela folhas, vagens e grãos, pode ser visualizada nas figuras 13, 14 e 15 respectivamente. A porcentagem máxima de  $^{14}\text{C}$  nas folhas foi observada para as plantas tratadas com  $^{14}\text{C}$ -ALN, ao passo que os demais compostos, mostraram uma distribuição similar entre si (Figura 13), evidenciando dessa forma, uma melhor recuperação desse composto pelas folhas. As vagens das plantas tratadas com as amidas e seus aminoácidos, diferiram estatisticamente das que receberam ALN, que recuperaram em torno de 5% do  $^{14}\text{C}$  absorvido comparado com o máximo de 2% da amida ASN (Figura 14), evidenciando dessa forma que os ureídos são mais rápidos e facilmente transportados para as vagens no período de enchimento de grãos. Independentemente do radioisótopo aplicado, a porcentagem de  $^{14}\text{C}$  foi estatisticamente a mesma para os grãos de todos os tratamentos (Figura 15), mostrando dessa forma, que apesar da ALN ter um papel fundamental na nutrição nitrogenada dos grãos durante o período

observado, ela deve ser previamente metabolizada, acarretando em perda do carbono marcado.

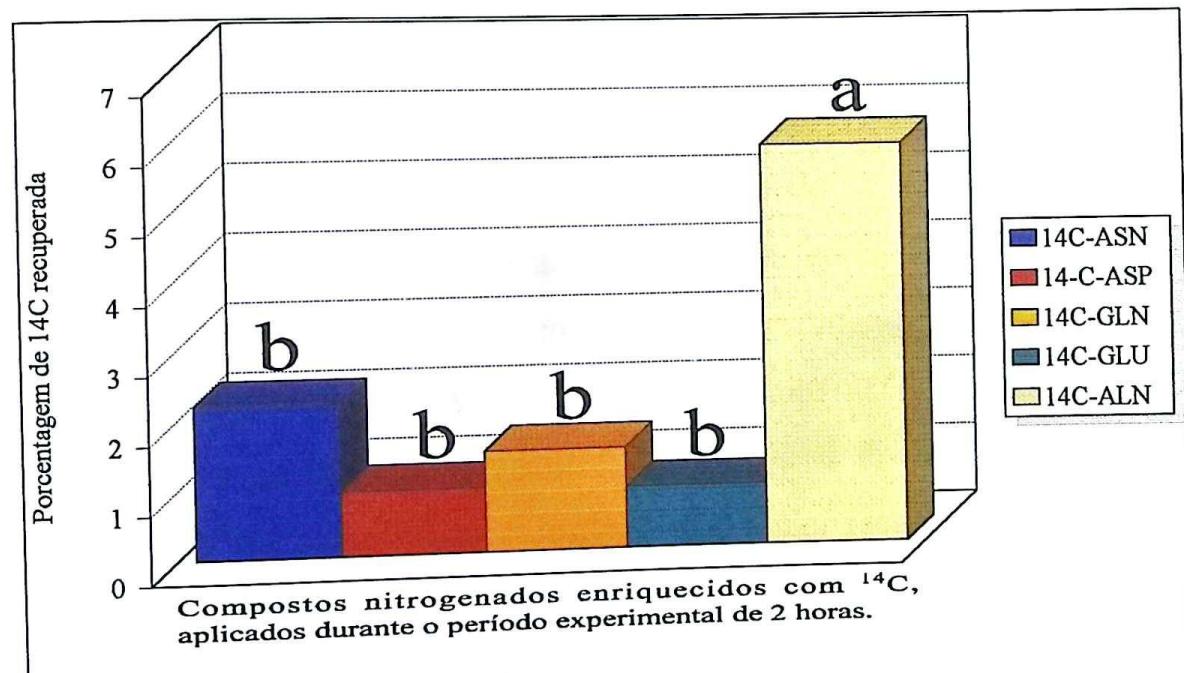
**Tabela 3:** Influência do período de pulso (0 e 120 minutos) em plantas de soja em fase de enchimento de grãos (média de todos os traçadores). As plantas que foram submetidas ao período de 120 minutos de pulso, logo em seguida a aplicação dos traçadores, receberam os mesmos compostos não marcados e na mesma concentração (10 mM).

Parte da planta	% $^{14}\text{C}$ /g de tecido		% $^{14}\text{C}$	
	c/pulso	s/pulso	c/pulso	s/pulso
<b>grãos</b>				
- grãos em formação	7,2 a	4,4 b	*****	*****
- grãos em enchimento	5,6 a	3,3 b	*****	*****
- grãos em estágio final de maturação	3,4 a	1,8 b	*****	*****
- todos os grãos	5,0 a	3,3 b	0,6 a	0,5 a
<b>vagens</b>				
- vagens dos grãos em formação	7,8 a	4,6 a	*****	*****
- vagens dos grãos em enchimento	4,0 a	3,0 a	*****	*****
- vagens em expansão máxima	3,8 a	2,1 b	*****	*****
- todas as vagens	5,2 a	3,4 a	2,5 a	2,0 a
<b>folhas</b>				
- última folha trifoliolada	*****	*****	2,0 a	1,7 a
- penúltima folha trifoliolada	*****	*****	1,7 b	2,7 a
- folha trifoliolada de localização mediana	*****	*****	1,2 a	1,3 a
- primeira folha trifoliolada	*****	*****	0,3 a	0,5 a
- todas as folhas	*****	*****	7,9 a	8,5 a

As letras somente comparam médias entre o período de pulso e sem pulso (teste de Tukey,  $P<0,05$ ).

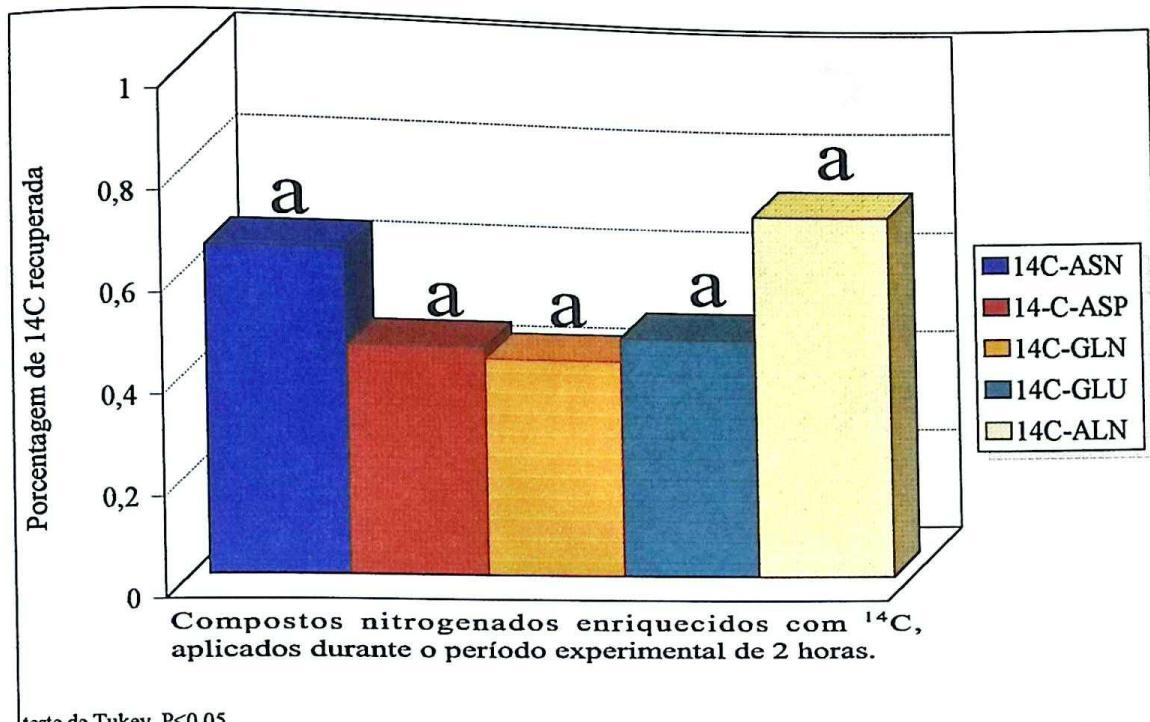


**Figura 13:** Porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada nas folhas de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados (ASN, ASP, GLN, GLU e ALA) via fluxo transpiracional.



teste de Tukey,  $P<0,05$ .

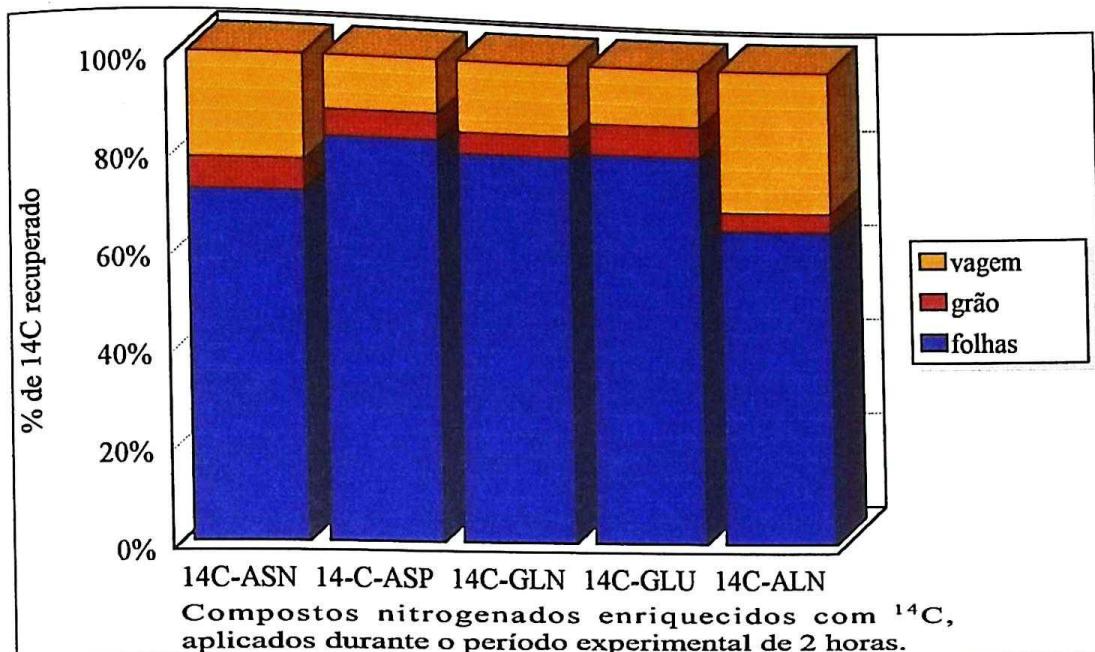
**Figura 14:** Porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada nas vagens de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados (ASN, ASP, GLN, GLU e ALA) via fluxo transpiracional.



teste de Tukey,  $P<0,05$ .

**Figura 15:** Porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada nos grãos de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados (ASN, ASP, GLN, GLU e ALA) via fluxo transpiracional.

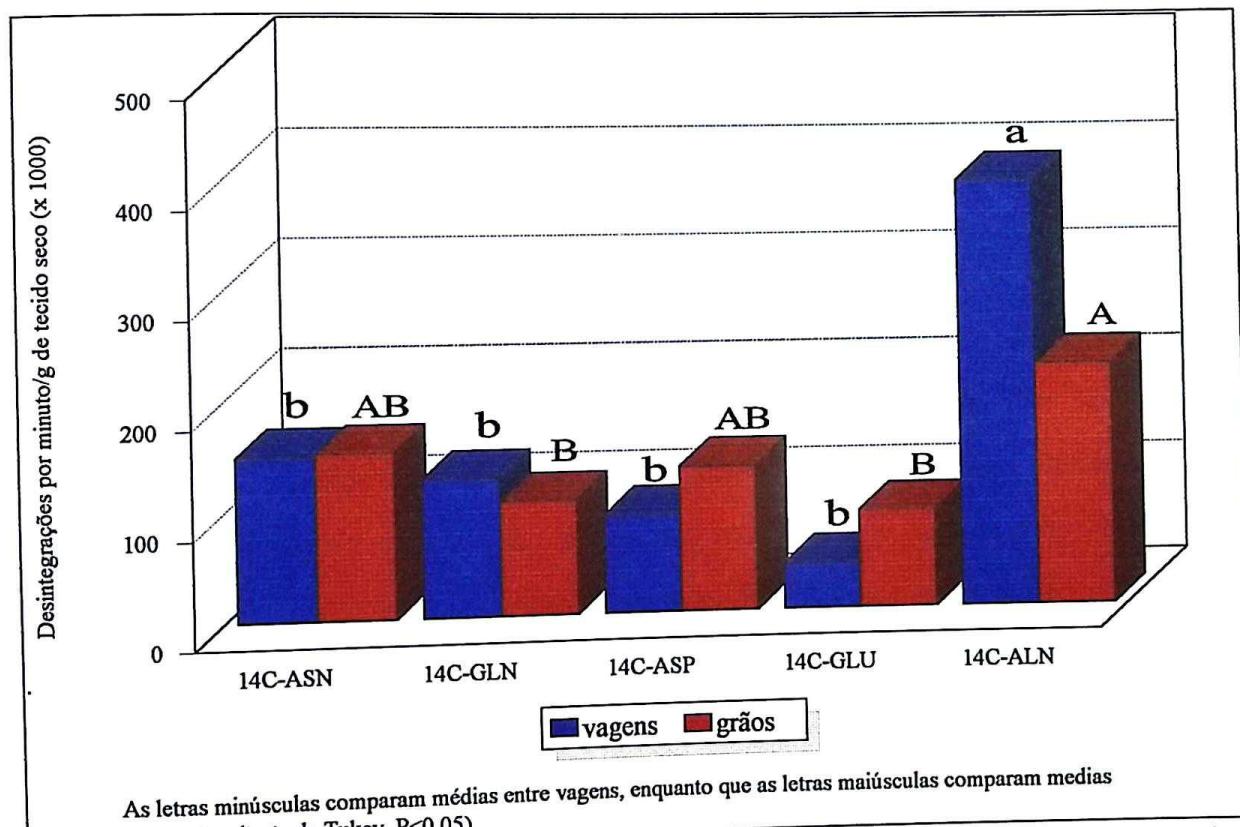
A distribuição percentual do  $^{14}\text{C}$ , nas vagens, grãos e folhas, para cada radioisótopo aplicado é mostrado na figura 16. Os grãos em todos os tratamentos apresentaram a menor porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperado, cerca de 5%, em contraste com as folhas que retiveram cerca de 76% do carbono recuperado. As plantas tratadas com ALN recuperaram a menor porcentagem  $^{14}\text{C}$  nas folhas, como consequência de um maior acúmulo nas vagens em relação aos aminoácidos estudados. Analisando a distribuição para cada composto nitrogenado, pode-se observar uma maior recuperação do marcador nas vagens das plantas supridas com ALN e ASN, sugerindo que esses compostos são preferencialmente transportados para os frutos de soja em formação, contrastando com os outros compostos presentes na seiva que também foram estudados.



**Figura 16:** Distribuição percentual do  $^{14}\text{C}$  recuperado nas plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados via de fluxo transpiracional.

A atividade específica das vagens e dos grãos, foi expressa em desintegrações por minuto/grama de tecido seco (DPM/g). Nas vagens, a ALN apresentou as maiores DPM/g enquanto que os demais compostos apresentaram uma distribuição similar. Para os grãos, foi observada uma diferença significativa entre as plantas supridas com GLU e sua amida correspondente (Figura 17), mostrando, assim, dois padrões distintos de distribuição tanto para as vagens quanto para os grãos. Pode-se observar ainda que as amidas, ASN e GLN, apresentaram DPM/g próximas, tanto para as vagens quanto para os grãos, sugerindo que esses compostos ao chegarem nas vagens passam diretamente para os grãos sem retenção. Já os aminoácidos, ASP e GLU, mostraram maiores DPM/g nos grãos em relação as vagens, o que indica que apesar desses compostos chegarem em menor quantidade para as vagens, são rapidamente transferidos para os grãos. A ALN mostra uma maior

quantidade translocada para a vagens onde se acumula preferencialmente, parecendo ser transportada lentamente para os grãos. Contudo esses modelos de distribuição acima especulados, das vagens para os grãos, merece ainda estudo. Considerando os ureídos a principal fonte de nitrogênio para as vagens, pode-se admitir que parte dos aminoácidos presentes na fase inicial de desenvolvimento destes órgãos sejam proveniente do metabolismo de ureídos supridos anteriormente, e que as altas DPM nos grãos das plantas supridas com  $^{14}\text{C}$ -ALN, podem ter sido originadas de uma transferência direta de uma fração desse composto. A baixa taxa de transferência do composto marcado para o grão pode ser decorrente do catabolismo da ALN para aminoácidos nas vagens.

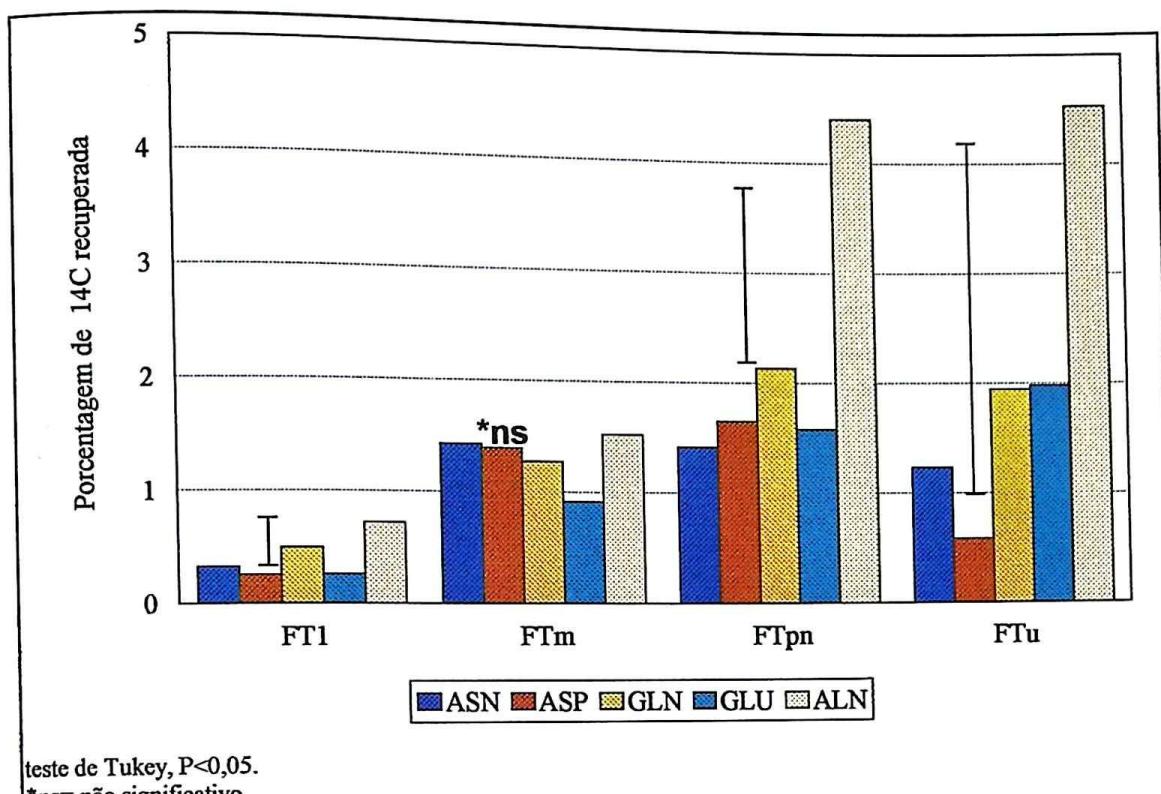


**Figura 17:** Desintegrações por minuto/grama (DPM/g) nas vagens e grãos de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados via fluxo transpiracional (valor médio de 4 repetições).

A porcentagem de  $^{14}\text{C}$  nas folhas em 4 pontos distintos da parte aérea (tendo como referencial inicial o nó cotiledonar), 1<sup>a</sup> folha trifoliolada (FT1), folha trifoliolada de localização mediana (FTm), penúltima folha trifoliolada (Ftpn) e última folha trifoliolada (FTu), são mostradas na figura 18. Na primeira folha trifoliolada, assim como na folha trifoliolada mediana podemos observar um padrão similar de distribuição para todos radioisótopos aplicados. As plantas tratadas com ALN apresentaram uma forte tendência para uma alta porcentagem de recuperação de  $^{14}\text{C}$  nas folhas mais novas, em relação aos outros compostos aplicados. Na penúltima folha trifoliolada pode-se notar um grande acúmulo para a ALN, a qual foi superior e significantemente diferente de todos os outros traçadores mostrando, dessa forma, que a ALN teve uma marcante distribuição para as regiões meristemáticas.

Na figura 19, podemos observar a porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada por grama de tecido para as vagens. Não houve diferenças entre os compostos nitrogenados nas vagens no estágio inicial de formação, ao passo que com o seu desenvolvimento, a ALN passa a ter uma grande importância, onde observa-se altas concentrações deste composto. Com relação ao estudo da porcentagem recuperada nos grãos (Figura 20), podemos especular a importância da ASN, na nutrição nitrogenada dos grãos, onde altos teores de  $^{14}\text{C}$  proveniente dessa amida foram encontrados. Nos grãos, com a metade do seu desenvolvimento, não foram observadas diferenças entre os compostos usados nas marcações, apesar da ASN e o ASP apresentarem maiores atividades específicas. É interessante notar a importância da ALN como fornecedor direto de nitrogênio, para os grãos em fase final de maturação, onde a sua atividade específica é estatisticamente diferente do GLU e da ASN.

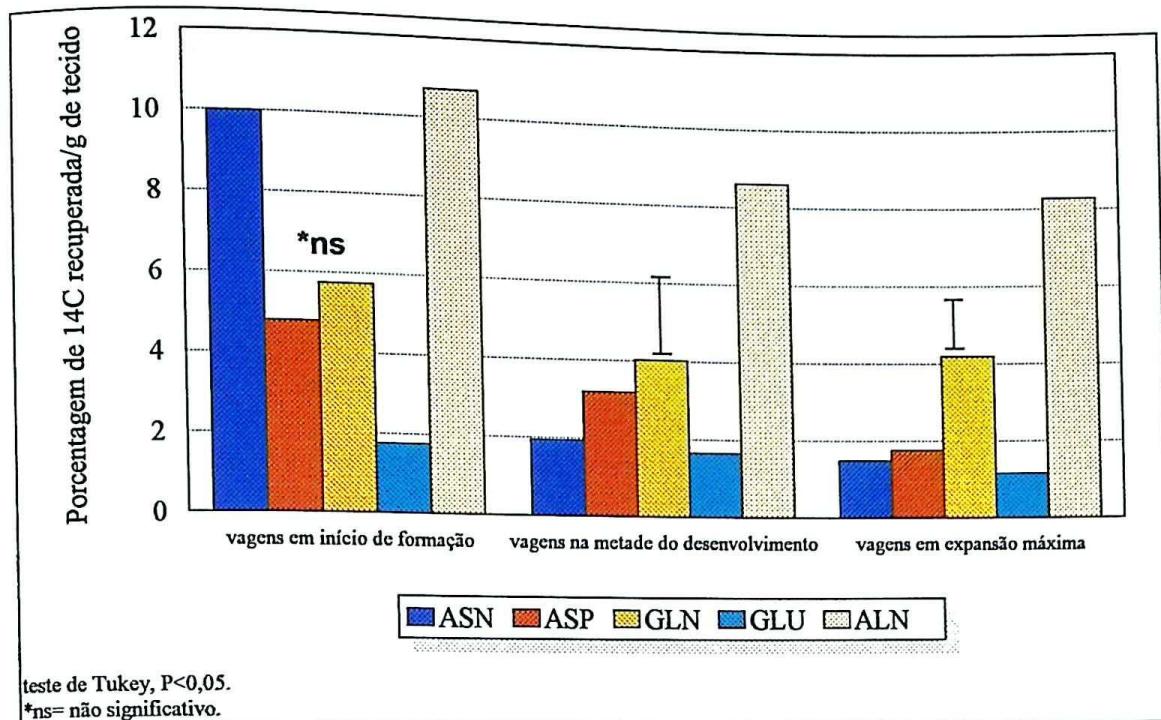
(principal fornecedor de nitrogênio para os grãos em formação).



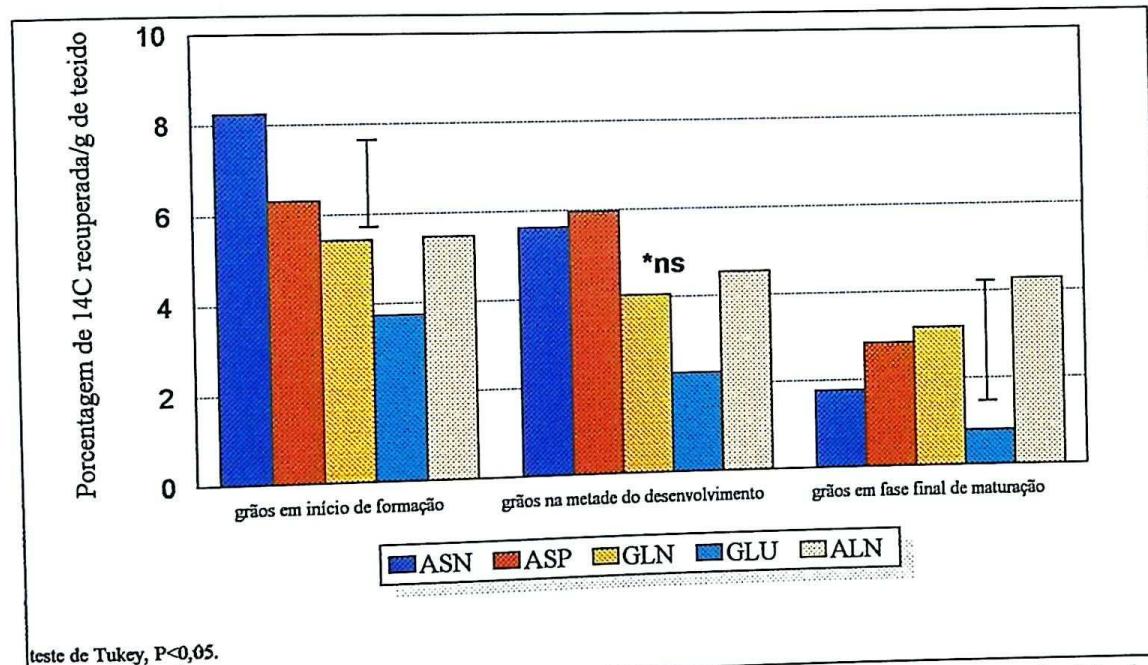
teste de Tukey,  $P<0,05$ .

\*ns= não significativo.

**Figura 18:** Porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada nas folhas, em 4 pontos distintos, de plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com  $^{14}\text{C}$ -ASN,  $^{14}\text{C}$ -ASP,  $^{14}\text{C}$ -GLN, GLU e  $^{14}\text{C}$ -ALN. FT1=1<sup>a</sup> folha trifoliolada, FTm=folha trifoliolada de localização mediana, FTpn=penúltima folha trifoliolada e FTu= última folha trifoliolada.

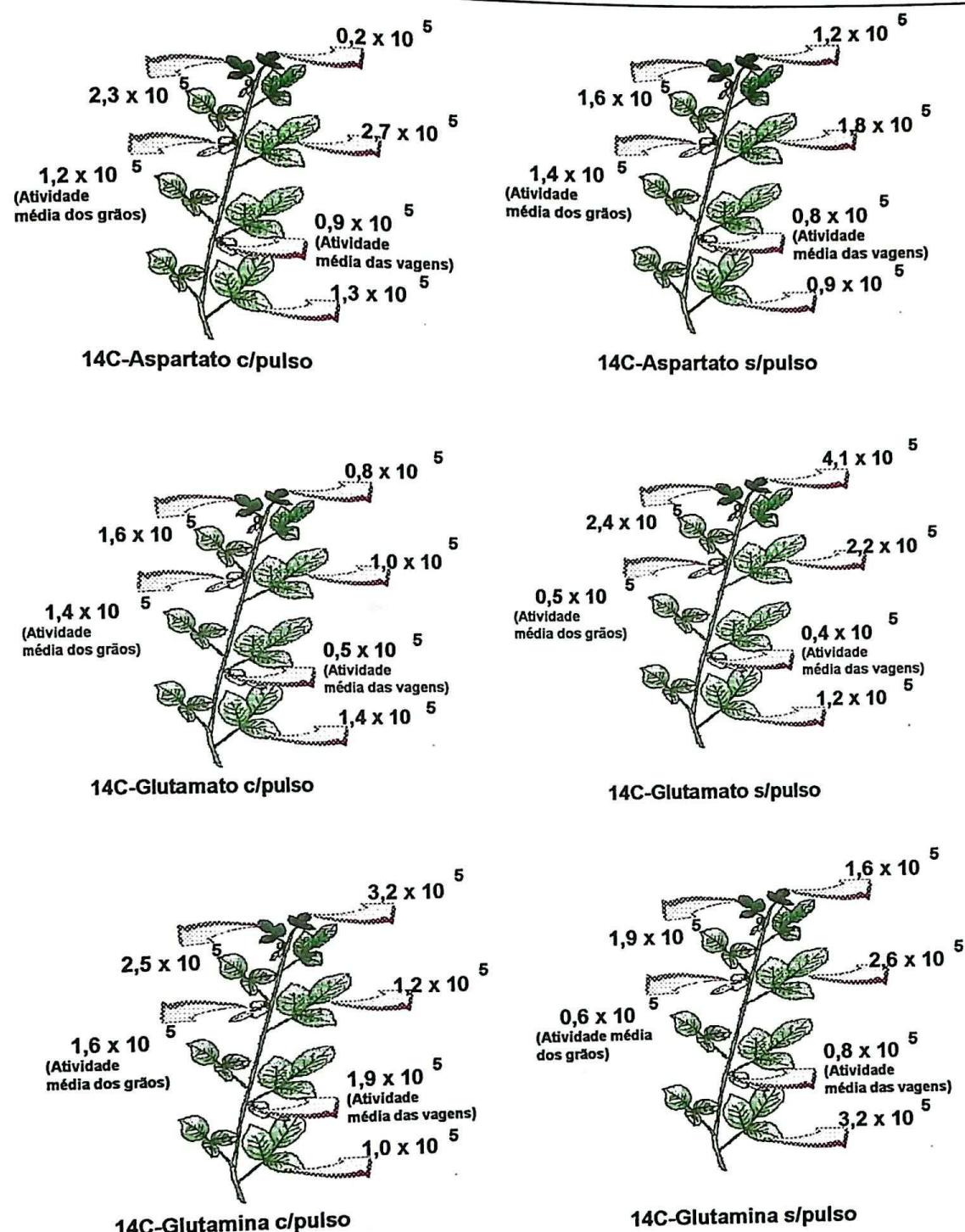


**Figura 19:** Porcentagem de  $^{14}\text{C}/\text{g}$  no tecido das vagens, em 3 idades diferentes, de plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com  $^{14}\text{C}$ -ASN,  $^{14}\text{C}$ -ASP,  $^{14}\text{C}$ -GLN,  $^{14}\text{C}$ -GLU e  $^{14}\text{C}$ -ALN.

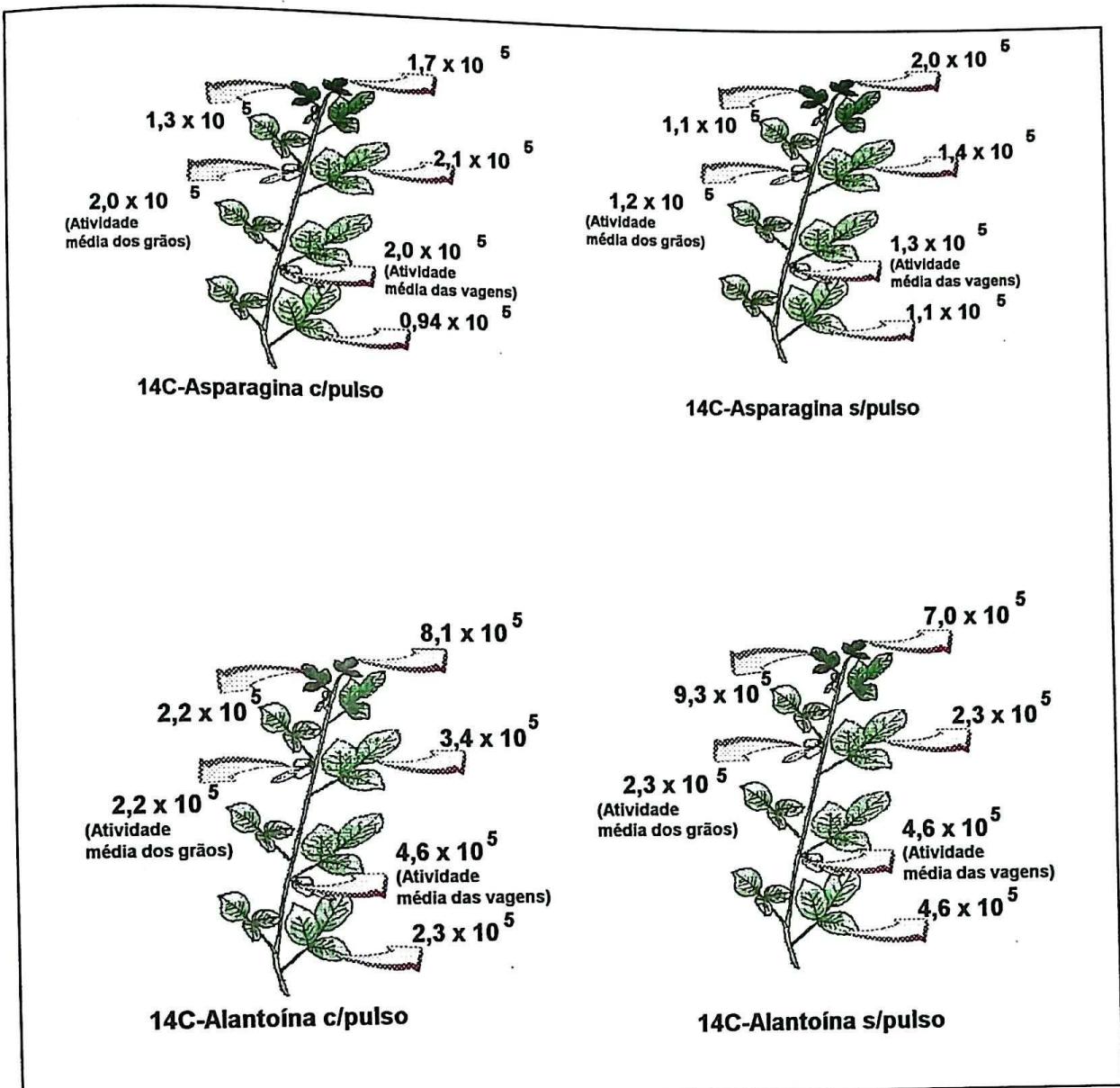


**Figura 20:** Porcentagem de  $^{14}\text{C}/\text{g}$  no tecido dos grãos, em 3 idades diferentes, de plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com  $^{14}\text{C}$ -ASN,  $^{14}\text{C}$ -ASP,  $^{14}\text{C}$ -GLN,  $^{14}\text{C}$ -GLU e  $^{14}\text{C}$ -ALN.

Na figuras 21 e 22, podemos observar a influência do período de 0 e 120 minutos de pulso em diversos pontos das plantas. Maiores concentrações de  $^{14}\text{C}$  são observadas para as vagens e grãos de todos aminoácidos e amidas correspondentes ao período de 120 minutos de pulso, ao passo que para ALN a duração do tempo de pulso não influenciou a distribuição do  $^{14}\text{C}$  para as vagens ou grãos, onde observa-se as mesmas DPM/g, indicando, assim, que a ALN teve o transporte para as vagens, assim como para as folhas mais novas, independente do período de pulso usado.



**Figura 21.** Desintegrações por minuto/g (DPM/g) em plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com  $^{14}\text{C}$ -ASP,  $^{14}\text{C}$ -GLU e  $^{14}\text{C}$ -GLN com pulso de 0 e 120 minutos.



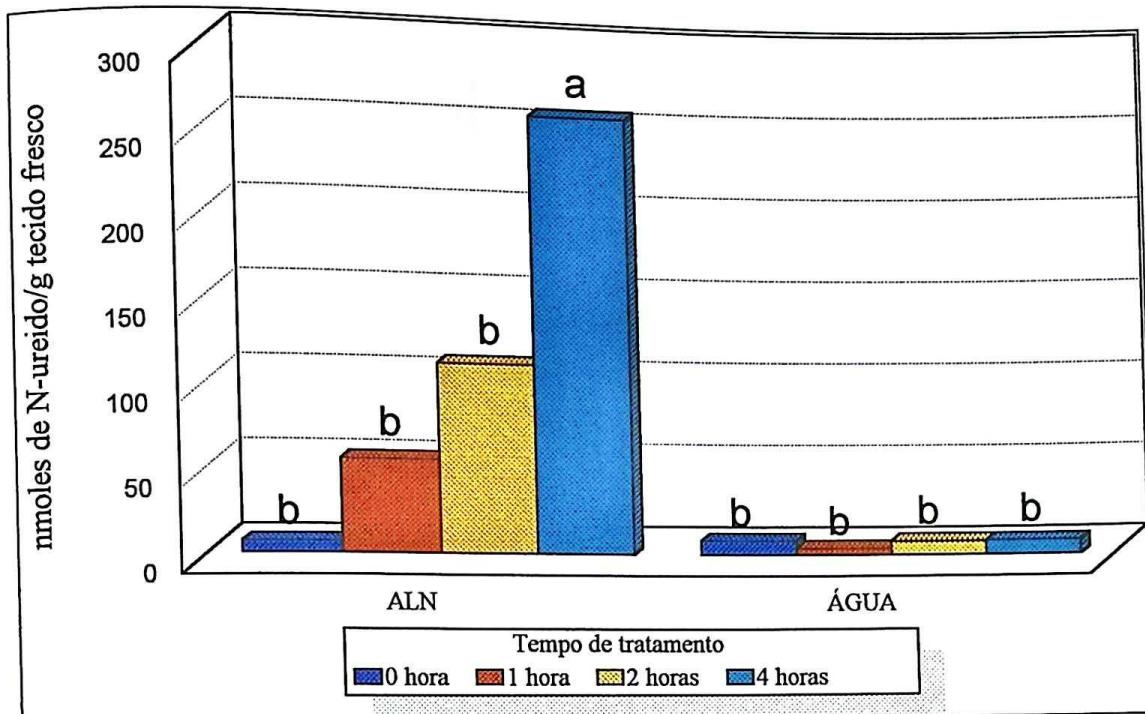
**Figura 22.** Desintegrações por minuto/g (DPM/g) em plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com  $^{14}\text{C}$ -ASN e  $^{14}\text{C}$ -ALN, com pulso de 0 e 120 minutos.

## Experimento II

### *Avaliação da influência de diferentes pulsos de ALN sobre o conteúdo de compostos nitrogenados solúveis na soja em fase reprodutiva.*

Foi realizado o cultivo de soja para verificar o efeito do suprimento de ALN e água (controle) em diferentes tempos, via fluxo transpiracional, na composição dos compostos nitrogenados solúveis do extrato foliar.

O teor de ureído no extrato mostrou que somente a partir de um período de 4 horas é que notamos um acúmulo significativo para a ALN. Contudo este composto parece estar sendo rapidamente catabolizado a amônia, pois ao passo em que foi detectada uma concentração máxima de 0,25 µmoles de N-ureído/g tecido fresco (Figura 23), no período de 4 horas de suprimento de ALN, neste mesmo período observou-se uma concentração de 3,50 µmoles de amônia/g de tecido fresco (Figura 24), não sendo observado este efeito para as plantas supridas somente com água (figuras 23 e 24). Provavelmente a ALN foi degradada até amônia, para posterior uso na biossíntese de aminoácidos, já que as folhas parecem ser eficientes sítios para degradação de ureídos.



**Figura 23:** Conteúdo de N-ureído no extrato de folhas de plantas supridas com diferentes pulsos de ALN e água.

Os teores de N-amônia livre nas plantas, foram significativamente influenciadas pelo aumento do tempo de pulso. As plantas supridas com ALN mostraram sempre um maior teor de amônia, quando comparadas com as plantas que tiveram o período de pulso somente com água. O teor de amônia livre aumentou proporcionalmente ao tempo de pulso nas plantas tratadas com ALN (figura 24).

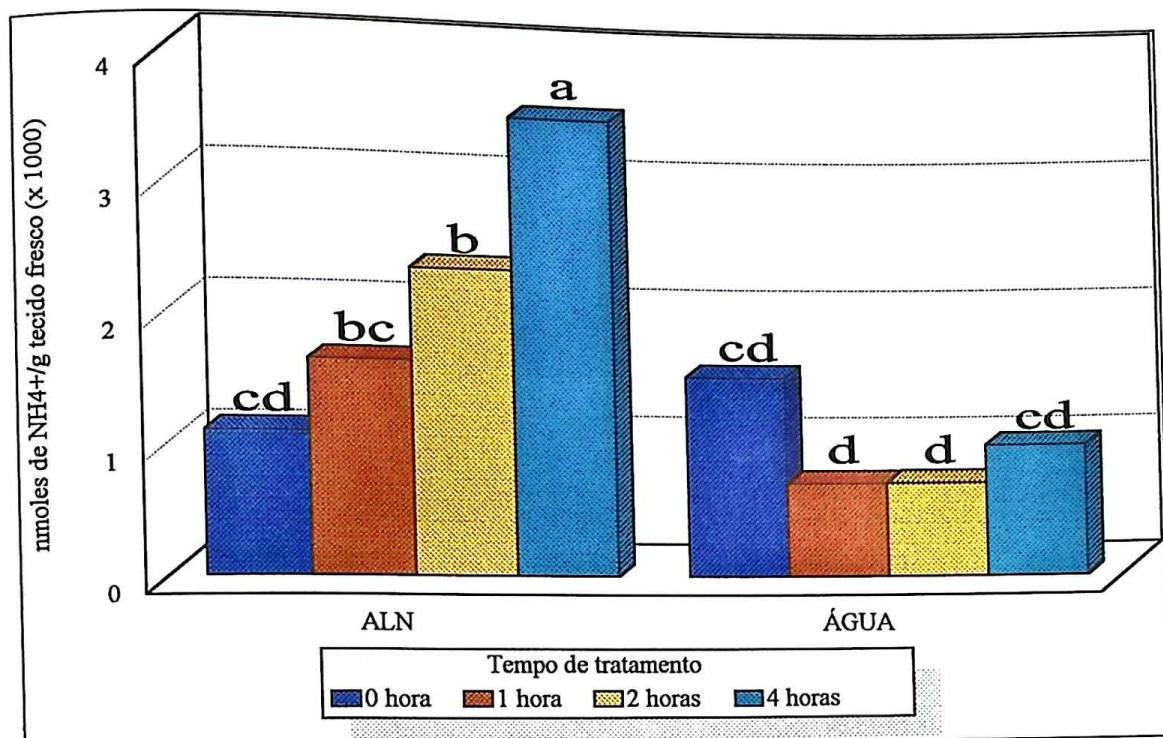
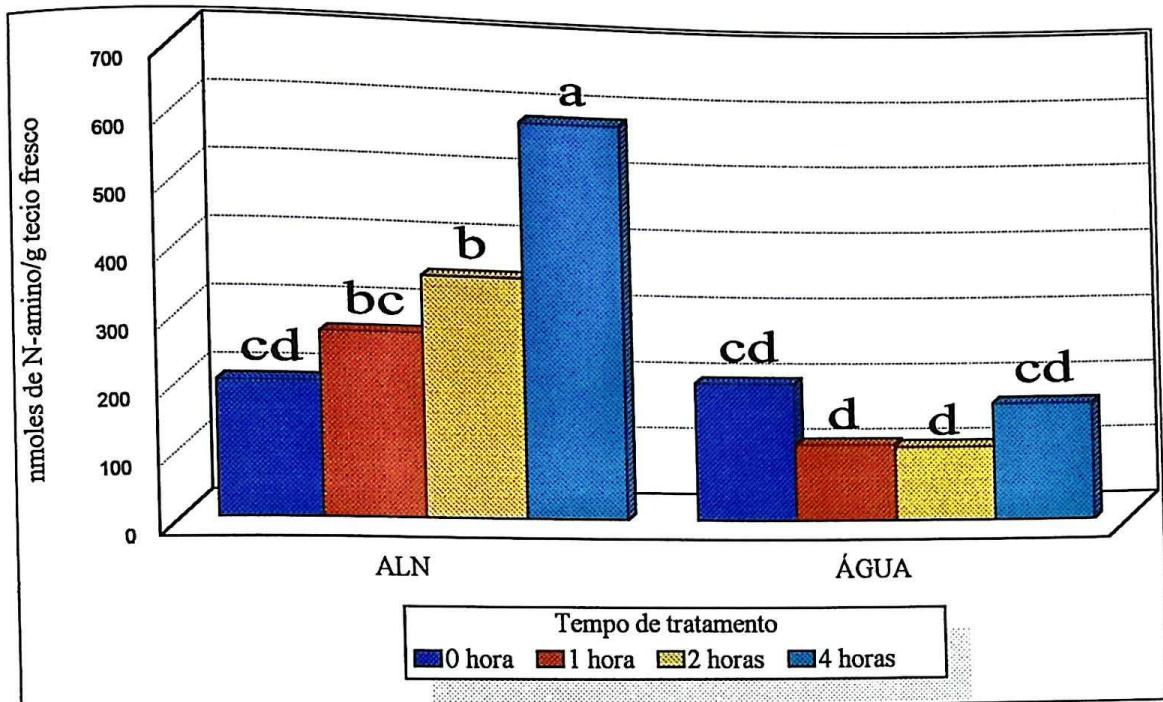


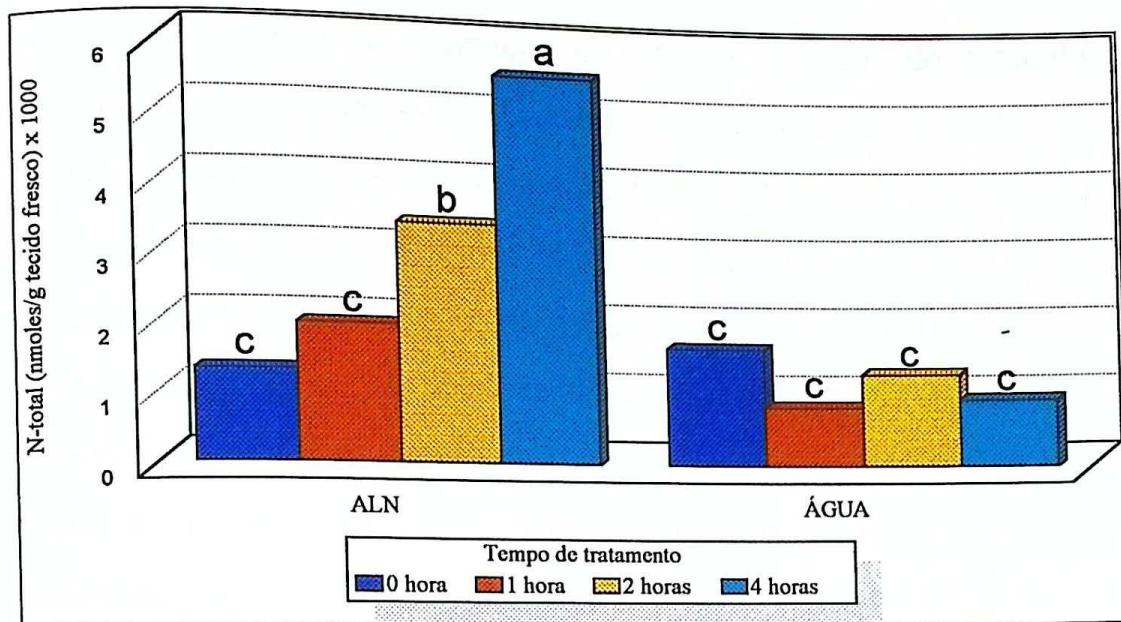
Figura 24: Conteúdo de amônia livre no extrato de folhas de plantas supridas com pulsos de ALN e água.

De modo similar, os teores de  $\alpha$ -aminoácidos aumentaram, proporcionalmente, ao tempo de pulso para as plantas tratadas com ALN (Figura 25), indicando uma alta atividade das enzimas de degradação de ALN. Isto demonstra que a degradação de ALN está ligada à formação de amônia e está, diretamente relacionado com a biossíntese de aminoácidos, o que já era esperado, pois um alto teor de amônia apresenta efeito fitóxico, por interferir nos processos de oxi-redução da célula, formação de ATP, disponibilidade de açúcares, etc.



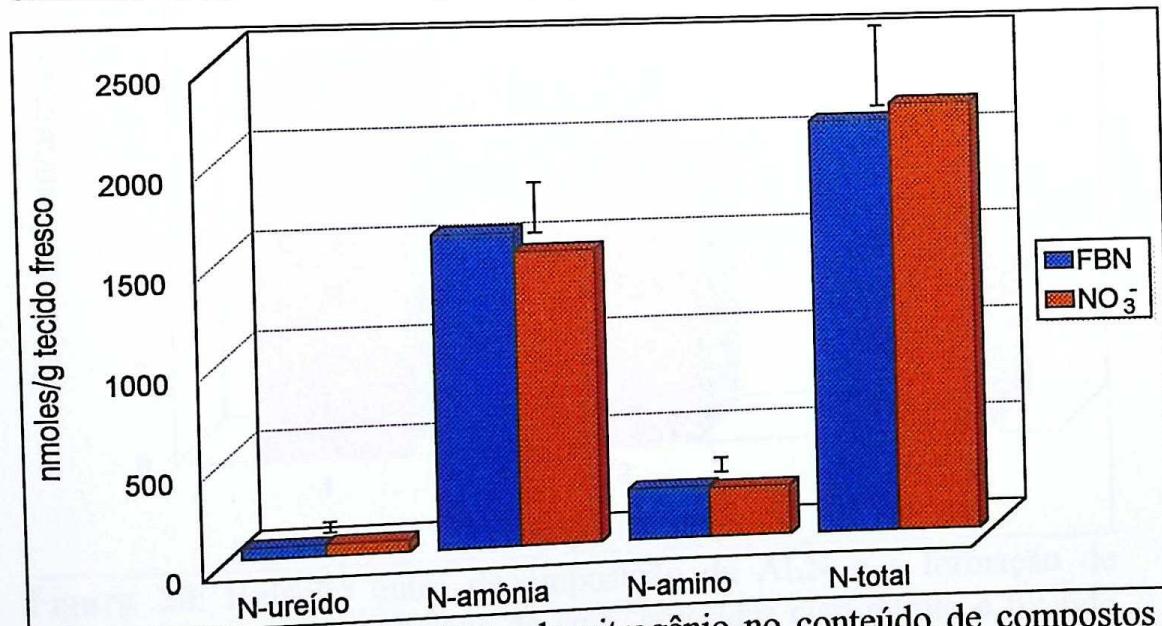
**Figura 25:** Conteúdo de  $\alpha$ -amino livre no extrato de folhas de plantas supridas com diferentes pulsos de ALN e água.

O N-total do extrato foi proporcional ao período de absorção da ALN, como já observada para os compostos solúveis acima ( $\alpha$ -aminoácido, ureídos e amônia). O N-total do extrato é, pois, a soma dos compostos nitrogenados solúveis, amônia, aminoácidos, amidas e ALN, não estando aqui incluído o N-nitrato devido a baixa sensibilidade do método para esse composto (Figura 26).



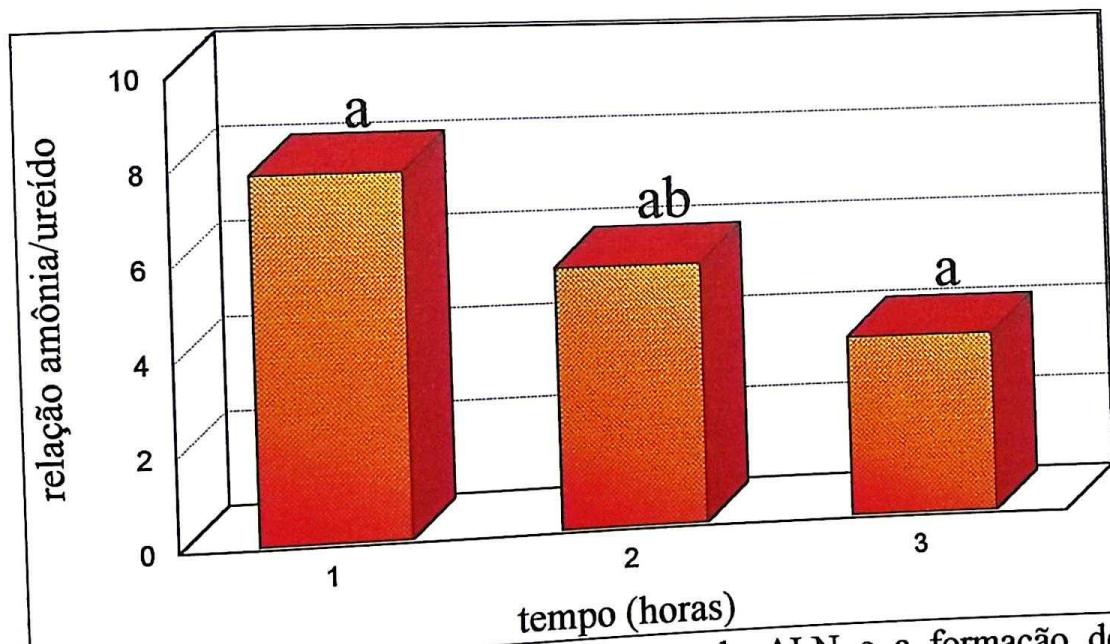
**Figura 26:** Conteúdo de N-total no extrato de folhas de plantas supridas com diferentes pulsos de ALN e água.

Não foi observada a influência da fonte de nitrogênio nos teores dos compostos solúveis, ou seja, as plantas cultivadas com nitrato são aptas a catabolizarem ALN com a mesma eficiência que as plantas associadas a bactérias fixadoras de nitrogênio (Figura 27).

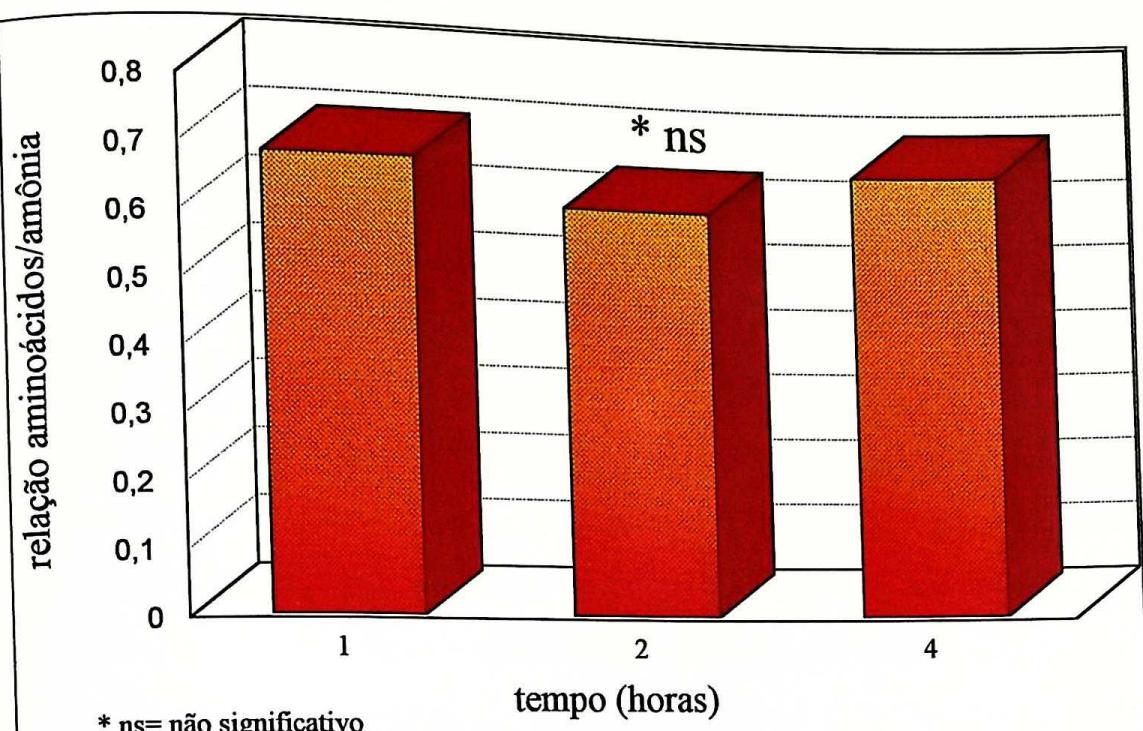


**Figura 27:** Influência da fonte de nitrogênio no conteúdo de compostos solúveis no extrato de folhas de plantas (média de 8 repetições).

As constantes de formação de amônia, a partir do catabolismo dos ureídos, e as constantes de formação de aminoácidos a partir de amônia ( $\text{alantoína} \Leftrightarrow \text{amônia} \Leftrightarrow \text{aminoácidos}$ ), foram calculadas. Observa-se na figura 28, que há uma diminuição proporcional da formação de amônia, com o tempo de absorção da ALN. No início praticamente toda a ALN foi convertida a amônia, porém com o passar do tempo esta taxa de catabolismo tende a baixar, apesar do conteúdo de ureído aumentar. A taxa de formação de aminoácidos a partir de amônia permaneceu inalterada durante as 4 horas de experimento indicando, assim, que não houve nenhum impedimento neste tipo de anabolismo (Figura 29). De certa forma isto mostra que a decomposição de ALN esteve associada a formação de aminoácidos, sendo provavelmente baixa a quantidade de ALN que foi armazenada como estoque de nitrogênio nesta fase da planta.



**Figura 28:** Relação entre decomposição da ALN e a formação de amônia em extratos de folhas de soja, crescidas com nitrato e fixando nitrogênio.



**Figura 29:** Relação entre o teor de amônia e a formação de aminoácidos, em extratos de folhas de plantas de soja crescidas com nitrato e fixando nitrogênio.

#### **4.4 – DISCUSSÃO**

Este estudo indicou uma grande diversidade nos padrões de distribuição dos compostos nitrogenados usualmente exportados pela via xilemática da soja, na fase reprodutiva, quando fixando nitrogênio simbioticamente. Alguns aminoácidos (ASN e GLN) foram retidos mais efetivamente nos tecidos vasculares das hastes, pecíolos e nervuras das folhas com pouca passagem para as regiões internervais das folhas (Figuras 9A e B). Outros (ASP e GLU) se acumularam amplamente nas folhas mais novas (Figuras 10A e B). Resultados semelhantes foram observados para *Lupinus* por McNeil *et al.* (1979), que relataram uma maior retenção das amidas pelos tecidos vasculares em relação aos aminoácidos ASP e GLU. Dessa forma, o processo de distribuição da ASN, GLN, GLU e ASP parece ser consistente tanto para soja quanto para *Lupinus*, espécie que transporta principalmente amidas. A ALN acumulou-se amplamente nas regiões meristemáticas das folhas mais novas, enquanto que nas folhas maduras só foi possível evidenciar este composto nas regiões das nervuras (Figura 11). Isto indica uma transferência mais fácil da

ALN para os tecidos mais ativos da parte aérea. Estes dados corroboram os obtidos por Yoneyama (1984a), que observou intensa transferência para as folhas mais novas do nitrogênio fornecido para a parte aérea de plantas de soja na forma de ALN, via fluxo transpiracional. Neste estudo, as plantas apresentaram uma maior recuperação para este composto, quando comparadas com as plantas supridas com ASN, GLN e  $\text{NO}_3^-$ . O fato dos ureídos serem transportados para as folhas mais novas (Figuras 11 e 18), também foi demonstrado por Thomas *et al.* (1980) e Rice *et al.* (1990) que concluíram que o tecido jovem é capaz de metabolizar os ureídos e, subsequentemente, usar como fonte primária de nitrogênio para a síntese de aminoácidos e proteínas. Confirmando estas evidências foi também observado no extrato foliar de plantas de soja em fase reprodutiva, uma alta taxa de produção de amônia, proveniente do catabolismo da ALN (Figura 28) e que deverá ser incorporada em aminoácidos (Figura 29). As investigações de Atkins *et al.* (1983) em caupi, usando afideos para coleta de seiva floemática, também demonstraram que  $^{14}\text{C}$ -ALN pode ser metabolizada nas folhas. De qualquer forma, não podemos descartar que a alta marcação nas folhas jovens, das plantas tratadas com ALN, também pode significar, um acúmulo temporário de nitrogênio, o qual poderia ser facilmente mobilizado e utilizado para a nutrição nitrogenada das vagens e grãos. Pode-se especular, ainda, que as interações iônicas com as paredes celulares e a seletividade da membrana das células que revestem o xilema foram, provavelmente, os principais fatores que determinaram a distribuição primária desses compostos para as regiões meristemáticas.

Neste trabalho, a marcação pelos ácidos aminados e suas amidas correspondentes, nos grãos mostrou-se mais intensa do que nas vagens, ao passo que para a ALN, observa-se o contrário, maior marcação nas vagens e

uma menor intensidade nos grãos (Figuras 9A,B; 10A,B e 11), evidenciando que a distribuição primária dos compostos nitrogenados para os órgãos reprodutivos depende da fonte de nitrogênio.

Algumas diferenças encontradas, em soja, na distribuição dos compostos nitrogenados oriundos da FBN, podem ser atribuídas a diferenças na idade fisiológica das plantas. De qualquer forma, a informação sobre o transporte e distribuição pelas diversas partes da soja, pode ajudar a esclarecer os melhores índices de colheita associados aos altos teores de ureídos na seiva xilemática, tal como observado por Neves *et al.* (1985).

Os ureídos foram mais rapidamente acumulados nas regiões meristemáticas, folhas e vagens, quando comparado com os demais compostos nitrogenados (Figuras 13 e 14), evidenciado assim um padrão, preferencial, de distribuição para estas partes. Os grãos mostraram uma porcentagem de recuperação similar para todos os compostos aplicados (Figura 15), indicando que os ureídos também foram importantes para a nutrição nitrogenada destes órgãos. Resultados semelhantes foram obtidos por Yoneyama & Kondo (1990), que estudando os compostos nitrogenados em diversas espécies de leguminosas, também observaram um grande acúmulo nos órgãos vegetativos e uma alta concentração de ureídos nas vagens de soja. Da mesma forma, Gomes & Sodek (1984) também encontraram teores significativos de ureídos em vagens de soja, principalmente, no período de enchimento dos grãos. Porém para McNeil & La Rue (1984), os ureídos não desempenham um papel importante no fornecimento de nitrogênio para os grãos. Apoiando esta hipótese, Wettlaufer & Obendorf (1991), estudaram os ureídos e amidas como fonte de nitrogênio para o crescimento e maturação de soja *in vitro* e observaram que os ureídos não foram substitutos efetivos para as amidas.

(ASN e GLN) como fonte de nitrogênio para os grãos. E de fato, segundo Rainbird *et al.* (1984), os ureídos não têm um papel direto na nutrição nitrogenada do grão. Esses autores, concluíram haver a necessidade do catabolismo deste composto, para formas aminoacídicas ou amídicas, para o fornecimento de nitrogênio necessário ao desenvolvimento dos grãos em plantas noduladas de soja. Dessa forma, o fato da ALN e dos aminoácidos apresentarem a mesma porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperado (Figura 15), pode ser especulada em termos de uma transferência direta de uma fração dos ureídos da corrente xilemática, de forma a suprir a grande demanda de nitrogênio necessária à síntese protéica do grão. Esta hipótese de uma transferência direta de uma fração desses compostos tem apoio nos resultados obtidos por Fujihara *et al.* (1977), que observaram que os grãos de soja, também possuíam uma alta atividade para a alantoinase, o que torna possível a degradação dos ureídos nesse local. Estudos com traçadores enriquecidos com  $^{15}\text{N}$  podem, entretanto, ajudar no entendimento desta questão pois, ao longo do catabolismo dos ureídos, os carbonos marcados podem ser perdidos ou ficar na forma de compostos que não acompanham o mesmo caminho do nitrogênio (Winkler *et al.*, 1987), sendo provavelmente esta razão pela qual os grãos das plantas supridas com ALN mostraram uma menor intensidade de marcação em relação as vagens.

Pode-se observar que o período de pulso (0 ou 120 minutos) aplicado, não interferiu na partição dos compostos nitrogenados para as vagens. Somente foi observado efeito significativo do período de pulso na partição dos compostos para os grãos, o qual contribuiu para uma melhor redistribuição (Tabela 2). É interessante notar que nas plantas tratadas com ALN, a atividade específica (DPM/g) para as vagens e grãos, com e sem pulso, são idênticas. O

fato das vagens e grãos, das plantas tratadas com ALN, não apresentarem aumentos com o período de pulso, 120 minutos, (Figuras 21 e 22) pode ser explicado pelo fato do catabolismo da ALN, acarretar perdas dos carbonos marcados (carbonos na posição 2 e 7) na forma de  $^{14}\text{CO}_2$  (Figura 6). Desta forma, os dados mostrados neste trabalho, para a ALN, podem estar subestimados. Shelp & Silva (1990) estudando a distribuição e o metabolismo dos ureídos e compostos aminados, observaram que os ureídos foram as maiores fontes de nitrogênio em todas as partes das plantas na fase vegetativa. Estes resultados, de certa forma, concordam com os encontrados para a fase reprodutiva, durante o período de enchimento de grãos, onde nota-se grande marcação do  $^{14}\text{C}$  proveniente da ALN em vagens e folhas.

A atividade específica, para ALN, foi maior nas vagens (Figura 17) do que nos grãos evidenciando que a ALN apresenta, em relação aos aminoácidos e amidas, a desvantagem de uma baixa transferência para os grãos que, de acordo com os resultados obtidos, só deve ocorrer após o catabolismo da ALN. Contudo a ALN parece apresentar a vantagem de um maior acúmulo nos frutos, dando a possibilidade de um suprimento de nitrogênio mais constante e regular para as vagens, enquanto que a aplicação de fertilizantes resultaria em um grande aumento nas concentrações de aminoácidos e nitrato nos órgãos das plantas, favorecendo o crescimento vegetativo, apresentando estas um menor número de vagens (Thomas & Schrader, 1980). Considerando ainda os ureídos a fonte primária de nitrogênio para as vagens, pode-se admitir que o catabolismo destes compostos, seguida do anabolismo de aminoácidos, constitui a fonte de nitrogênio para outros aminoácidos não-supridos ou supridos inadequadamente ao fruto pelo xilema ou pelo floema, quando fixando nitrogênio.

A distribuição percentual do  $^{14}\text{C}$  nas vagens, grãos e folhas para cada radioisótopo aplicado é mostrado na Figura 16. Analisando a distribuição para cada composto nitrogenado, pode-se observar uma maior recuperação nas vagens das plantas supridas com ALN, mostrando mais uma vez que os frutos de plantas de soja fixando nitrogênio, dependem diretamente do ureídos para sua nutrição nitrogenada. Mosquim & Sodek (1992) também sugeriram que em soja, os ureídos são mobilizados preferencialmente para a nutrição nitrogenada dos frutos, uma vez que estes compostos podem ser metabolizados nas paredes das vagens.

As vagens em início de formação (Figura 19) não mostraram diferença estatística para os traçadores aplicados, porém pode-se observar que tanto ALN como GLN mostram uma maior tendência de acúmulo nas vagens novas podendo ser consideradas como importantes fornecedores de nitrogênio para estes órgãos. Apesar das taxas de transferências para os frutos de todos os compostos nitrogenados diminuírem com a idade de maturação, assim mesmo, os ureídos mostraram-se significativamente superiores. Aparentemente, isto não é um problema para a nutrição do grão, pois segundo Gomes & Sodek (1984) com o desenvolvimento da vagem também ocorre um aumento nas enzimas degradativas de ureídos o que explica, então, porque com o desenvolvimento do fruto houve ainda um grande direcionamento de ureídos. Uma elevada porcentagem de recuperação de  $^{14}\text{C}$  por grama de tecido (%  $^{14}\text{C}/\text{g}$ ) (Figura 20) pode ser observada para as plantas tratadas com ASN, mostrando que esse aminoácido é rapidamente transportado para os grãos em início de formação, ao passo que com o desenvolvimento, a ALN passa a ter uma importância maior. O fato dos grãos apresentarem densidades constantes de marcação, com o seu desenvolvimento, para as plantas tratadas com ALN

(Figura 20), parece ser função de uma transferência direta de uma fração dos ureídos aliada a uma taxa constante do catabolismo destes compostos nos frutos. Estes resultados indicam que os ureídos são capazes de manter um melhor suprimento de nitrogênio ao longo de toda a fase de enchimento de grãos, necessário ao desenvolvimento das vagens e sementes, acarretando melhores índices de colheita.

## 4.5 - CONCLUSÕES

- As plantas que foram tratadas com ALN, mostraram uma melhor distribuição de nitrogênio para as folhas mais novas, indicando assim, o envolvimento da alantoína na produção de aminoácidos necessários as regiões meristemáticas e outros locais onde haja anabolismos relacionados à síntese protéica.
- As vagens acumularam grandes quantidades de ALN sendo, assim, consideradas eficientes sítios de catabolismo para os ureídos, onde altas densidades de marcação para este composto mostraram-se presentes em todos os graus de maturação dos frutos.
- Os grãos, de um modo geral, recuperaram uma fração da  $^{14}\text{C}$ -ALN aplicada, indicando que estes tecidos são capazes de catabolizar ureídos.

- O fato dos níveis dos ureídos proporcionarem, para as vagens e grãos, uma nutrição nitrogenada mais constante e rápida durante todo o período de desenvolvimento desses órgãos, pode ser uma forma de explicar porque as bactérias que aumentam o conteúdo de ureído na seiva xilemática, das plantas que fixam nitrogênio, apresentam melhores índices de colheita e grãos mais protéicos.

## **5 - CONCLUSÕES GERAIS**

- As modificações feitas, na patente americana, possibilitaram o enriquecimento desse composto com um alto grau de pureza e um menor custo de produção.
- Foi possível o pedido de patente do novo método para sintetizar alantoína.
- A ALN foi mais facilmente e rapidamente transportada para as regiões meristemáticas.
- A ALN apresentou um padrão de distribuição distinto em relação aos outros compostos estudados, tanto para as vagens quanto para os grãos.

- Os programas de seleção de estirpes de rizóbio, visando o aumento da produção de grãos de soja, devem considerar o transporte do nitrogênio fixado durante o período reprodutivo.

## **6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AKAO, S.** Nitrogen fixation and metabolism in soybean plants. *JARQ*, v.25, p.83-87, 1991.
- ATKINS, C. A.** Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In: *Biology and biochemistry of nitrogen fixation* (M. J. Dilworth and A. R. Glenn, eds). Elsevier Science, Amsterdam, p.293-319, 1991.
- ATKINS, C. A.; PATE, J. S.; PEOPLES, M. B. & JOY, K. M.** Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. *Plant Physiology*, v. 71, p.841-848, 1983.
- ATKINS, C. A.; PATE, J. S.; PEOPLES, M. B.** Metabolism and translocation of allantoin in ureide-producing grain legumes. *Plant physiology*, v.70, p.476-482, 1982.

- BOHLEY, P.** Reihenbestimmungen von stickstoff in ultramikromasstab; kjeldahverrashung und Phenolhypoclorite Reaktion. Hoppe Seyler's Z. *Phisiol. Chem.* V. 348, p. 100-110, 1967.
- CONN, E. E.; STUMPF.** Metabolismo de amônia e monômeros nitrogenados. In: *Introdução à bioquímica*, Edgard Blucher, p.380-416, 1990.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMAN.** I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.5, p.155-161, 1970.
- FAO.** *FAO Quart. Bull. Statist.*, v.1, p. 66, 1993.
- FELKER, P.** Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. *Anal. Chem.*, v.49, p.1080, 1977.
- FUJIHARA, S.; YAMAMOTO, K.; YAMAGUCHI, M.** A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant Soil*, v.48, p.233-238, 1977.
- GOI, S. R.; NEVES, M. C. P.** Teor de ureídos, tipos de nódulos e atividade da nitrogenase de leguminosas forrageiras florestais e de grão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.17 n.1, p.42-50, 1982.
- GOI, S. R.; NEVES, M. C. P.** Efeito da cultivar, estirpe de *Rhizobium* e nitrogênio mineral na produção de ureídos em soja, feijão e leucena. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.22 n.2, p.163-170, 1987.
- GOMES, M. A. F.; SODEK, L.** Allantoinase and asparaginase activities in maturing fruits of nodulated and non-nodulated soybeans. *Plant phisiology*, v.62, p.150-159, 1984.
- HARTMAN, W.W.; MOFFETT, E.W.; DICKEY, J. B.** Allantoin. In: *Organic synthesis*. v. 2, p. 21-23, 1943.

- HAWLEY, G.G.** Diccionario de química y productos químicos. *Ediciones Omega*, S.A. Casanova, Barcelona, 1975.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M. B.** Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by  $^{15}\text{N}$  methods. *Plant Physiology*, v.93, p.495-503, 1990.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.** Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.9-89, 1994.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J.** Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biology and Fertility of Soils*, p.325-329, 1989.
- KEYSER, H. H.; FUDI LI.** Potencial for increasing biological nitrogen fixation in soybean. *Plant and Soil*, v.141, p.119-135, 1992.
- MAGALHÃES, J. R.; HUBER, D. M. & TSAI, C. Y.** Evidence of increased N-ammonium assimilation in tomato plants with exogenous alfa-ketoglutarate. *Plant Science*, v.85, p. 135-141, 1992.
- MAHIN, D. T.; LOFBERG, R. T.** A simplified method of Sample Preparation for Determination of Tritium, Carbon-14, or Sulfur-35 in Blood or tissue by Liquid Scintillation Counting, *Anal. Biochem.*, v.16, p.500-509, 1966.
- MCNEIL, D. L., ATKINS, C. A.; PATE, J. S.** Uptake and utilization of xylem-borne amino compounds by shoot organs of a legume. *Plant physiology*, v.63, p.1076-1081, 1979.

- McNEIL, D. L.; LA RUE, T. A. Effect of nitrogen source on ureides in soybean. *Plant Physiology*, v.74, p.227-232, 1984.
- MIALL, L. M.; MIALL, S. Diccionario de quimica. 2<sup>a</sup> ed. *Editorial Atlante*, S.A. México, D.F, 1953.
- MITCHELL, H. T. Microdetermination of nitrogen in plant tissue. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, v.55, p.1-3, 1972.
- MOSQUIM, P. R.; SODEK, L. Partitioning of nitrogen in soybean fruit explants cultured with glutamine, asparagine or allantoin. *Plant Physiology Biochemistry*, v.30, n.4 p.451-457, 1992.
- MSTAT-C. A micropcputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Norway: MSTAT Distribuition, n.p., 1988.
- NEVES, M. C. P. HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.6, n.3 p.267-321, 1987.
- NEVES, M.C.P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico Rhizobium-leguminosas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.5, n.2 p.79-92, 1981.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DÖBEREINER, J. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribuition in soybeans. *Journal Experimental Botany*, London, v.169, p.1179-1192, 1985.
- NISHI, C. Y. M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação na soja [Glycine max (L.) Merril] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com estirpes semia 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasilia, v.31, n.5 p.359-368, 1996.

**NORRIS, D. O.; T' MANNETJE, L.** The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In: relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, v.29, p.214-235, 1964.

**OHYAMA, T.** Comparative studies on the distribution of nitrogen in soybean plants supplied with N<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> at the pod filling stage. *Soil Science Plant Nutrition*, v.29, p.133-145, 1983.

**OHYAMA, T.; KUMAZAWA, K.** Nitrogen assimilation in soybean nodules. II <sup>15</sup>N<sub>2</sub> assimilation in bacteroid and cytosol fractions of soybean nodules. *Soil Science Plant Nutrition*, v.26, p.205, 1980.

**PATE, J. S.** Synthesis, transport and utilization of products of symbiotic nitrogen fixation. In: *Plant Nitrogen Metabolism*. (J. E. Poulton, J. T. Romeo and E. E. Conn, eds), Plenum Press. p.65-115, 1989.

**PATE, J. S.** Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review Plant Physiology*, v.31, p.313-340, 1980.

**PEOPLES, M. B.; ATKINS, C. A.; PATE, J. S.; MURRAY, D. F.** Nitrogen nutrition and metabolic interconversion of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. *Plant Physiology*, v.77, p.382-388, 1985.

**PEOPLES, M. B.; HEBB, D. M.; GIBSON, A. H.; HERRDGE, D. F.** Development of the ureide assay for measurement of nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Journal of Experimental Botany*, v.40, p.535-542, 1989.

**PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.** Variabilidade de eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.8, p.193-196, 1984.

- RAINBIRD, R. M.; THORNE, J. H.; HARDY, R.W.F.** Role of amides, aminoacids and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiology*, v.74, p.329-334, 1984.
- RAWSTHORNE, S.; MINCHIN, F. R.; SUMMERFIELD, R.J.; COOMBS, J.** Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochemistry*, v.19, p.341, 1980.
- RICE, C. F.; LUKASZAWISKI, K. M.; BLEVINS, D. G.; WINKLER, R. G.; RANDAL, D. D.** Changes in ureide synthesis, transport and assimilation following ammonium nitrate fertilization of nodulated soybeans. *Journal of Plant nutrition*, v.13 n. 12, p.1539-1553, 1990.
- ROSSUM, VAND.; MUYOTCHA, A.; VERSEVELD, H.W.; STOUTHAMER, A.H.; BOOVERO, F.C.** Effect of *Bradyrhizobium* strain and host genotype, nodule dry weight and leaf area on groundnut (*Arachis hypogaea* L. ssp *fastigiata*) yield. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.154, p.279-288, 1993.
- SANTOS, V. F. A.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.** Efficiency of soybean nodules related to rhizobia hydrogenase is influenced by light level. *R. Bras. Fisiol. Veg.* v.8, n. 1, p.15-21, 1996.
- SAWAZAKI, H. E., SODEK, L.; LOPES, E. S.** Efeito da fonte externa de nitrogênio no transporte de compostos nitrogenados em plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merril] cultivar Santa Rosa, In: *Anais da XII Reunião Latino-americana sobre Rhizobium*, Instituto Agronômico de Campinas, 1986.
- SCHUBERT, K. R.** Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Annual Review Plant Physiology*, v.37, p.539-574, 1986.

- SHELP, B. J.; IRELAND, R. J.** Ureide metabolism in leaves in nitrogen-fixing soybean plants. *Plant Physiology*, v.77, p.779-783, 1985.
- SHELP, B. J.; SILVA, M. C.** Distribution and metabolism of xylem-borne ureido and amino compounds in developing soybeans shoots. *Plant Physiology*, v.94, p.1505-1511, 1990.
- STEBBINS, N. E.; POLACCO, J. C.** Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiology*, v.109, p.169-175.
- THE MERCK INDEX.** An Encyclopedia of Chemical, drugs and biologicals. 10<sup>a</sup> edição, 1983.
- THOMAS, R. J.; FELLER, U.; ERISMAN, K. H.** Ureide metabolism in non-nodulated *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, v.31, p.409-417, 1980.
- THOMAS, R. J.; SCHRADER, L. E.** Ureide metabolism in high plants. *Phytochemistry* v.20, p.361-371, 1981.
- VARGAS, M. A. T.; MENDES, I.; de C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.** *Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, (EMBRAPA-CPAC. Comunicado técnico, 62), 3p, 1992.
- VINCENT, J. M.** A manual for the practical study of root nodule bacteria. I.B.P. Handbook n.15. *Blackwell Scientific Publishers*, London, 164p., 1970.
- VOGELS, G. D. & DRIFT, C. van der.** Differential analysis of glyoxylate derivates. *Anal. Biochemistry*, v.33, p.143-157, 1970.
- WETTLAUFER, S. H. & OBENDORF, R. L.** Ureides and amides as nitrogen sources for soybean seed growth and maturation in vitro. *Crop Sci.*, v.31, p.1319-1323, 1991.

- WINKLER, R. G.; BLEVINS, D. G.; POLACCO, D. D.; RANDALL, D. D. Ureide catabolism in soybeans. II. Pathway of catabolism in intact tissue. *Plant Physiology*, v.83, p.585-591, 1987.
- WINKLER, R. G.; BLEVINS, D. G.; RANDALL, D. D. Ureide catabolism in soybeans. III. Ureidoglycolate amidohydrolase and allantoate amidohydrolase are activities of an allantoate degrading enzyme complex. *Plant Physiology*, v.86, p.1084-1088, 1988.
- WOHL, A.; LANGE, M. Aufbau des Milchsäurealdehyds. Berichte, p. 3612-3614, 1908.
- YEMM, E. W & COCKING, E. C. The determination of aminoacid with ninhydrin. *Analyst*, v.80, p.209-213, 1955.
- YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrate, asparagine, and allantoin in the soybean shoot at the grain-filling stage. *Soil Science Plant Nutrition*, v.30, p.583-587, 1984b.
- YONEYAMA, T. Partitioning and metabolism of nitrogen, supplied as nitrate, amides, and allantoin to detached vegetative shoots of soybean via transpiration stream. *Soil Science Plant Nutrition*, v.30, p.333-343, 1984a.
- YONEYAMA, T.; ISHIZUKA, J.  $^{15}\text{N}$  study on the partitioning of the nitrogen taken by soybeans from atmospheric dinitrogen, medium nitrate or ammonium. *Soil Science Plant Nutrition*, v.28, p.451-461, 1982.
- YONEYAMA, T.; KARASUYAMA, M.; KOUCHI, H.; ISHIZUKA, J. Occurrence of ureide accumulation in soybean plants. *Soil Science Plant Nutrition*, v.31, p.133-140, 1985.

**YONEYAMA, T.; KONDO, M.** *Sesbania* spp., *Aeschynomene indica* and *Crotalaria* spp. are amide-exporters. *Soil Science Plant Nutrition*, v.36, p.689-693, 1990.

**ZELLNER, C. N.; STEVENS, J. R.** Method for synthesizing allantoin, *United States Patent Office* 2158098, 1939.

## **ANEXO 1**

**Informações sobre o isótopo  $^{14}\text{C}$  para proteção e segurança contra a radiação inonizante**

Normalmente,  $^3\text{H}$  e  $^{14}\text{C}$  são usualmente tóxicos devido a sua rápida substituição em tecidos biológicos. Entretanto  $^3\text{H}$  e  $^{14}\text{C}$  podem ser muito tóxicos quando essa renovação for lenta (ácidos nucléicos). Sendo assim, deve ser reconhecido que o trabalho com radioisótopos envolve um certo risco, fato este às vezes esquecido.

Dados do isótopo  $^{14}\text{C}$  para proteção contra radiações ionizantes.

Meia vida	5730 anos
Emissão principal	Beta 0,156 MeV (máximo)
Monitoração para contaminação	Final da janela fina do contador Geiger Müller
Monitoração biológica	Amostra de urina Mensuração da respiração ( $\text{CO}_2$ )
Limite de admissão anual por ingestão	$9 \times 10^7 \text{ Bq} (\sim 2,4 \text{ mCi})$ (compostos orgânicos marcados)
Alcance máximo no ar	24 cm
Alcance máximo na água	0,28 mm

Há a possibilidade de que alguns compostos orgânicos enriquecidos com  $^{14}\text{C}$  podem ser absorvidos por luvas. Precisa-se também ter cuidado para não gerar gás carbônico ( $^{14}\text{CO}_2$ ) o qual pode ser inalado.

## **ANEXO 2**

**Sumário das análises de variância dos diversos experimentos do capítulo  
II**

**2.1 - Sumário das análises de variância da atividade específica (DPM/g) nas vagens e grãos de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados ASN, ASP, GLN, GLU e ALA (valor médio das vagens e grãos)<sup>1</sup>.**

Fonte de Variação	G.I.	Quadrados Médios ( x 1000)	
		vagens	grãos
Pulsos	1	30	298**
Radioisótopos	4	100**	18**
Interação	4	3	5
Erro	10	9	3
Total	19		
C.V. %		25,7	14,1

\* Significância P< 0,05

\*\* Significância P< 0,01

---

<sup>1</sup>Dados normalizados através da aplicação da raiz quadrada.

**2.2 - Sumário das análises de variância da porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada na parte aérea de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com os compostos nitrogenados ASN, ASP, GLN, GLU e ALA.**

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		folhas	vagens	grãos
Pulsos	1	1,5	1,2	0,2
Radioisótopos	4	29,1*	17,1**	0,1
Interação	4	5,1	0,1	0,1
Erro	10	3,5	0,8	0,1
Total	19			
C.V. %		22,6	39,3	53,4

\* Significância  $P < 0,05$

\*\* Significância  $P < 0,01$

**2.3 - Sumário das análises de variância da porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada nas folhas em 4 pontos distintos de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com os compostos nitrogenados ASN, ASP, GLN, GLU e ALA. FT1=1<sup>a</sup> folha trifoliolada, FTm=folha trifoliolada de localização mediana, FTpn=penúltima folha trifoliolada e FTu=última folha trifoliolada.**

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		FT1	FTm	FTpn	FTu
Pulsos	1	0,20**	0,04	0,41*	0,02
Radioisótopos	4	0,09*	0,05	0,44**	1,01
Interacção	4	0,04	0,10	0,42	0,36
Erro	10	0,02	0,05	0,07	0,26
Total	19				
C.V. %		21,7	19,7	18,7	37,1

\* Significância P<0,05

\*\* Significância P<0,01

**2.4 - Sumário das análises de variância da porcentagem de  $^{14}\text{C}$  recuperada nas folhas em 4 pontos distintos de plantas de soja, em fase de enchimento de grãos, supridas com os compostos nitrogenados ASN, ASP, GLN, GLU e ALA. FT1=1<sup>a</sup> folha trifoliolada, FTm=folha trifoliolada de localização mediana, FTpn=penúltima folha trifoliolada e FTu=última folha trifoliolada.**

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		FT1	FTm	FTpn	FTu
Pulsos	1	0,20**	0,04	0,41*	0,02
Radioisótopos	4	0,09*	0,05	0,44**	1,01
Interação	4	0,04	0,10	0,42	0,36
Erro	10	0,02	0,05	0,07	0,26
Total	19				
C.V. %		21,7	19,7	18,7	37,1

\* Significância P < 0,05

\*\* Significância P < 0,01

**2.5 - Sumário das análises de variância da atividade específica (DPM/g) nos grãos, em 3 idades diferentes, de plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados ASN, ASP, GLN, GLU e ALA.**

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		grãos em formação	grãos em enchimento	grãos em estágio final de maturação
Pulos	1	38,9**	26,3*	12,4**
Radioisótopos	4	10,8**	8,5	28,4**
Interação	4	4,3	2,9	4,1
Erro	10	0,6	2,9	11,7
Total	19			
C.V. %		13,1	38,3	42,1

\* Significância  $P < 0,05$

\*\* Significância  $P < 0,01$

**2.6 - Sumário das análises de variância da atividade específica (DPM/g) nas vagens, em 3 idades diferentes, de plantas de soja em fase de enchimento de grãos, supridas com compostos nitrogenados ASN, ASP, GLN, GLU e ALA<sup>1</sup>.**

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		vagens dos grãos em formação	vagens dos grãos em enchimento	vagens em elongação máxima
Pulsos	1	1,9	0,3*	1,1**
Radioisótopos	4	1,9	1,0**	1,5**
Interação	4	0,3	0,1	0,2
Erro	10	0,9	0,1	0,1
Total	19			
C.V. %		39,1	14,0	15,7

\* Significância  $P < 0,05$

\*\* Significância  $P < 0,01$

---

<sup>1</sup>Dados normalizados através da aplicação da raiz quadrada.

**2.7 - Sumário das análises de variância do N-total e dos compostos nitrogenados no no extrato de folhas de plantas de soja em fase reprodutiva.**

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios (x 1000)			
		N-ureído	N-amônia	N-amino	N-total
Repetição	2	6	169	4	338
Tratamentos (1) (ALN x H <sub>2</sub> O)	1	126**	18727**	502**	41872**
Fonte de N (2) (FBN x NO <sub>3</sub> )	1	0,4	114,3	1	83,2
Interação	1	0,8	0,9	1	93
<b>1 x 2</b>					
Pulsos (3)	3	37**	3332**	95**	9261**
Interacção	3	36**	3684**	94**	13299**
<b>1 x 3</b>					
Interacão	3	1	35	4	448
<b>2 x 3</b>					
Interacão	3	1	10	0,7	758
<b>1 x 2 x 3</b>					
Erro	30	4	169	6	469
Total	47	100,0	26,6	30,4	31,7
C.V. %					

\* Significância P<0,05

\*\* Significância P<0,01

**2.8 - Sumário das análises de variância da relação amônia/ureido e aminoácido/amônia no no extrato de folhas de plantas de soja em fase reprodutiva.**

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		amônia/ureido	aminoácido/amônia
repetição	2	5,87	0,03
fonte de N (1) (FBN x NO <sub>3</sub> )	1	1,13	0,04
pulsos (2)	2	23,28*	0,01
interação 1 x 2	2	0,01	0,01
Ero	10	3,32	
Total	17		
C.V. %		31,33	15,71

\* Significância p<0,05

\*\* Significância p<0,01

## **ANEXO 3**

**Pedido de patente do processo para preparação de Alantoína**



Ministério da  
Agricultura e do  
Abastecimento

Empresa Brasileira de  
Pesquisa  
Agropecuária  
Embrapa

SAIN - Parque Rural  
70770-901 Brasília - DF

Telefone (061) 347-4101  
Fax (061) 347-4158  
Telex (61) 2074

---

Telefax CPI.DTC.S/Nº

Para / To: NORMA GOUVÉA RUMJANECK/  
SEVERINO MATIAS DE ALENCAR- CNPAB

Fax Nº: (021) 682.1230

De / From: Coordenadora da Coordenadoria  
de Propriedade Intelectual - CPI/DTC      Nº de páginas (pages): 09

Data / Date: 02.10.97

1 OUT 10 11 000249

DEPÓSITOS E PETIÇÕES  
DE PATENTES

ATENÇÃO (AN. 127 ITÉM 5.1).  
O PROTOCOLO O LADO É PROVISÓRIO  
O DEFINITIVO, SE O NÃO, SERÁ COLO-  
CADO A SÍA DE POSIÇÃO NA DATA  
ESPECIFICADA ABAIXO.

A PARTIR DE 01/11/97  
Assinatura Número (2)

## DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de  
Certificado de Adição

(uso exclusivo do INPI)

depósito / /

Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
 1.2 Qualificação:  
 1.4 Endereço completo:  
 SAIN - PARQUE RURAL - W/3 NORTE FINAL  
 70770-901 - BRASÍLIA - DF  
 1.5 Telefone: (061) 348-4296  
 FAX: (061) 347-4158
- 1.3 CGC/CPF: CGC 00.348.003/0001-10

( ) continua em folha anexa

**2. Natureza:**

- 2.1 Invenção  2.1.1. Certificado de Adição  2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada:

**3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):**

**PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE ALANTOÍNA**

( ) continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão do pedido nº.** \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

**5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:**

Nº de depósito \_\_\_\_\_ Data de Depósito \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ (66)

**6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):**

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

## INVENTORES

7.1 Nome: **Maria Cristina Prata Neves**

7.2 Qualificação: Pesquisador (Bióloga)

7.3 Endereço: EMBRAPA (CNPAB), Antiga Rodovia Rio-São Paulo Km 47,  
Seropédica - RJ

7.4 CEP 23851-970

7.5 Telefone: (021) 682-1500

7.1 Nome: **Severino Matias de Alencar**

7.2 Qualificação: Agrônomo

7.3 Endereço: UFRRJ, Antiga Rodovia Rio-São Paulo Km 47, Seropédica –  
RJ

7.4 CEP 23851-970

7.5 Telefone: (021) 682-1210

7.1 Nome: **Norma Gouvêa Rumjanek**

7.2 Qualificação: Pesquisador (Farmaceutica)

7.3 Endereço: UFRRJ, Antiga Rodovia Rio-São Paulo Km 47, Seropédica –  
RJ

7.4 CEP 23851-970

7.5 Telefone: (021) 682-1500

7.1 Nome: **Silas Varella Fraiz Júnior**

7.2 Qualificação: Professor (Engenheiro Químico)

7.3 Endereço: UFRRJ, Antiga Rodovia Rio-São Paulo Km 47, Seropédica –  
RJ

7.4 CEP 23851-970

7.5 Telefone: (021) 682-1210

**Relatório descritivo sobre o “PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DE ALANTOÍNA”.**

A presente invenção diz respeito a um processo de preparação de alantoína a partir de uma molécula do éster etílico do ácido dicloroacético com duas moléculas de uréia, apresentando rendimentos satisfatórios, e por conseguinte, pode ser aplicada nas indústrias de cosméticos, farmaceutica e trabalhos de pesquisas onde haja a necessidade deste composto enriquecido ou com  $^{14}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ .

Conhecem-se vários processos que permitem a produção direta de alantoína, em um único estágio, como por exemplo o processo de produção da alantoína a partir do éster do ácido glioxílico Chemical Abstracts, Vol. 97, 55807, a síntese a partir da reação de um derivado do ácido acético com uréia Vol. 97, 92275 com dissubstituídos do ácido acético como, por exemplo, a síntese de alantoína a partir de uma molécula do éster etílico do ácido dicloroacético, na patente americana 2.158.698, porém em todos estes casos uma grande quantidade de agente condensante e solvente é requerida, onerando de certa forma os custos de produção.

Para se evitar recorrer a um processo de duas fases, com o isolamento de compostos intermediários, propôs-se, na patente americana 2.158.698, apresentada em 16 de maio de 1939, em nome do Requerente, fazer mudanças nas proporções dos reagentes utilizados e condições de reação, de forma a proporcionar um melhor rendimento, pois o rendimento da patente americana é de no máximo 45%, e também a obtenção de um composto com alto grau de pureza.

A presente invenção tem por fim fornecer um processo direto de produção de alantoína, que apresente um resultado satisfatório e que possa ser facilmente aplicado em qualquer um dos usos em que este composto possa ser utilizado, não apresentando os inconvenientes acima citados dos processos conhecidos.

5

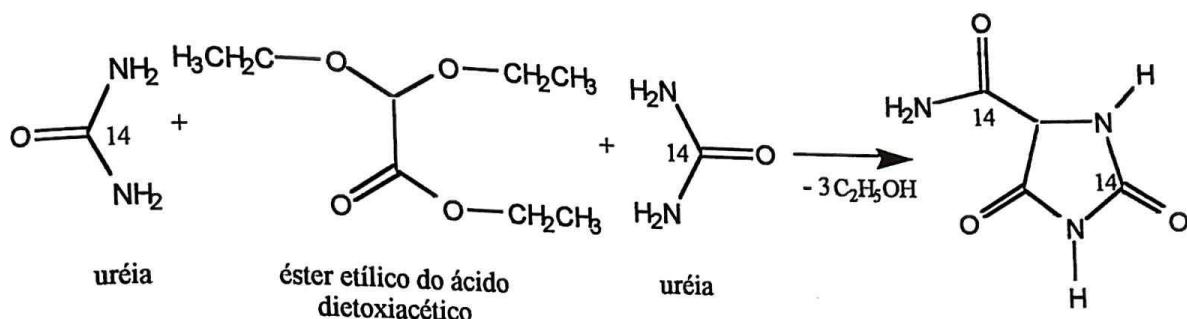
Para tanto, diz pois respeito a um processo de produção direta de alantoína, em única etapa, a partir de uma molécula do éster etílico do ácido dicloroacético com duas moléculas de uréia, onde a relação molar uréia/éster etílico do ácido dicloroacético foi diminuída, o tempo de condensação reduzido e a permanência em banho de gelo por 24 horas, após o final da reação, foi eliminado, proporcionando dessa forma um melhor rendimento teórico da alantoína.

10

A alantoína (5-ureidoidantoína) é o produto da condensação química de duas moléculas de uréia com uma molécula de um ácido orgânico. 15 Ela está estreitamente relacionada com muitas substâncias nitrogenadas complexas que existem em animais e plantas.

15

Na prática a presente invenção é um caso típico, onde uma molécula do éster etílico do ácido dicloroacético é reagida com duas moléculas de uréia como mostrado na equação abaixo:



O éster etílico do ácido dicloroacético pode ser facilmente obtido, escrito por Wohl e Lange, Bericht: 41, 3612, podendo ser reagido como ilustrado na equação acima.

A reação é realizada em uma única etapa, sem o isolamento de intermediários. Empregou-se como solvente o etileno glicol e como agente condensante o ácido clorídrico na quantidade de moles por mol de éster etílico do ácido dicloroacético. Os reagentes iniciais são normalmente empregados, na quantidade molar, de 2 moles de uréia por 0,8-1,2 moles do éster etílico do dicloroacético.

A reação se processou a uma temperatura de 80-110<sup>0</sup> C, durante um tempo de 7-10 horas. Após a completa reação o produto foi isolado e purificado através de filtrações e lavagens. A alantoína foi obtida com rendimento superior a 65% e um alto grau de pureza.

4/4

## Exemplo:

A alantoína foi obtida da seguinte maneira:

Reagentes empregados:

Quantidades em gramas:

- éster etílico do ácido dicloroacético	1,7
- uréia	1,5
- etileno glicol monoetil éter	1,4
- HCl conc.	0,4

Os reagentes acima foram aquecidos sob refluxo em um balão de fundo redondo de 250 ml em um banho de óleo a 110° C por 10 horas.

Depois do período de refluxo, o balão foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente. O produto foi filtrado a vácuo, lavado com porções de 1,0 ml de água, depois por 1,0 ml de álcool e, finalmente, por 1 ml de éter. O rendimento foi de 0,8 gramas ou 65 porcento do rendimento teórico.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de alantoína, a partir da condensação do éster etílico do ácido dicloroacético com uréia, em presença do HCl como agente condensante e etileno glicol monoetil éter como solvente, estando os reagentes em condições de concentração diferentes do exemplo citado e temperatura (70-110 °C) de forma que o rendimento seja de 65 porcento ou maior.

2. Processo para sintetizar alantoína que compreende a reação de compostos dissubstituídos do ácido dicloroacético, como o éster metílico do ácido dicloroacético.

3. Processo para sintetizar alantoína a partir de uréia com o éster etílico do ácido dicloroacético, onde seja usado qualquer solvente do grupo do alquileno glicol.

4. Processo para sintetizar alantoína a partir de uréia com o éster etílico do ácido dicloroacético, onde seja usado qualquer tipo de ácido inorgânico como agente condensante.

### RESUMO

Patente de invenção: “PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ALANTOÍNA A PARTIR ÉSTER ETÍLICO DO ÁCIDO DICLOROACÉTICO COM URÉIA”. A presente invenção se refere a um processo para a síntese de alantoína em um único estágio por reação do éster etílico do ácido dicloroacético com uréia, na presença de ácido clorídrico como agente condensante e etileno glicol monoetil éter como solvente do meio reacional.