

MODELOS QUIMICOS EN LA FIJACION DE NITROGENO

Daniel Rabinovich y Richad P. Korswagen*

INTRODUCCION

Las plantas, como todo ser vivo, necesitan y obtienen carbono, hidrógeno y oxígeno del aire y del agua. Además necesitan nitrógeno, fósforo y potasio como nutrientes primarios; calcio, magnesio y azufre como nutrientes secundarios y varios otros elementos en cantidades mínimas, llamados oligoelementos.

Aun cuando los requerimientos alimentarios los satisface con frecuencia el propio suelo o el hombre a través del uso de abonos y fertilizantes, existe un mecanismo sumamente importante por el cual las plantas obtienen nitrógeno del aire, proceso conocido con el nombre de fijación de nitrógeno.

La fijación del nitrógeno atmosférico por microorganismos, en efecto, es un proceso cuya importancia sólo es superada por la fotosíntesis. Ella radica en que es un paso fundamental en el ciclo del nitrógeno, y hace aprovechable dicho elemento para la nutrición de las plantas.

Resulta un proceso interesante dado que la fijación del nitrógeno se lleva a cabo fácilmente en diversas bacterias, algas azul-verdes, levaduras y en aso-

* PUCP, Departamento de Ciencias, Sección Química.

ciaciones simbióticas entre bacterias y legumbres, presentándose en condiciones suaves, no obstante que el nitrógeno resiste obstinadamente el ataque químico ordinario, aun en condiciones severas.

Las bacterias del suelo fijan el nitrógeno del aire, convirtiéndolo en amoníaco, gracias a una metaloenzima que cataliza el proceso, la nitrogenasa. El amoníaco resultante no sólo fertiliza la planta huésped, sino que escapa a los alrededores, estimulando así el crecimiento de otras especies.

Las primeras contribuciones al estudio de la fijación del nitrógeno se deben a nombres como D. Burk, P. W. Wilson y A. I. Virtanen, pero la elucidación bioquímica del proceso enzimático involucrado tuvo recién un gran impulso a partir de 1960, año en que se logró preparar extractos libres de células con capacidad de fijar nitrógeno [1]. Aun cuando en la actualidad todavía no se conocen totalmente ni los mecanismos de fijación ni las estructuras completas de las especies participantes, existe un conjunto de modelos que tratan de reproducir el comportamiento de la nitrogenasa y explicar este trascendental proceso natural.

EL CICLO DEL NITROGENO

El Ciclo del Nitrógeno en la Naturaleza, esquematizado en la Figura 1, involucra al nitrógeno junto con sus compuestos en cinco procesos básicos:

1. Fijación del nitrógeno del aire por microorganismos (cerca del 70%), por la producción industrial de fertilizantes (cerca del 30%) y por la formación de óxidos de nitrógeno por descargas eléctricas en la atmósfera.

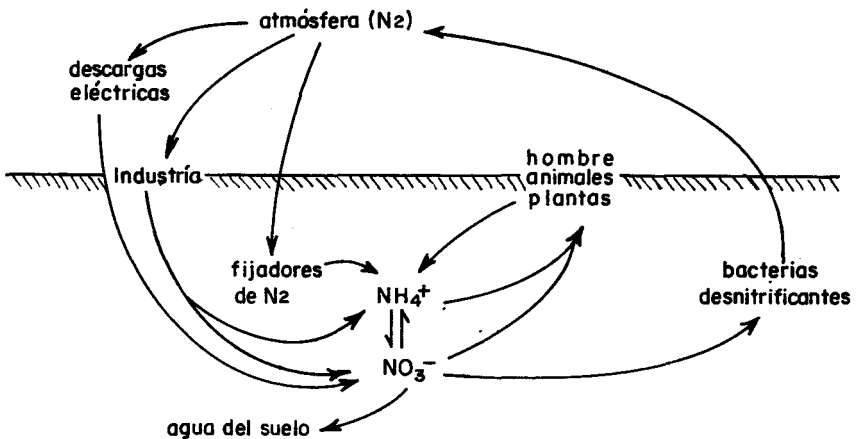


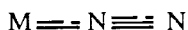
Fig. 1: Ciclo del Nitrógeno.

2. Uso de los nitratos del suelo por las plantas para formar proteínas.
3. Producción de compuestos amoniacales en plantas y animales que se descomponen.
4. Nitrificación de compuestos amoniacales a nitritos y luego a nitratos, parte de los cuales son lavados por el agua del suelo.
5. Reducción de nitratos y nitritos a nitrógeno por la acción de bacterias desnitrificantes.

Como en todo ciclo natural, se trata de procesos interdependientes, por lo que es evidente la importancia de la fijación del nitrógeno por microorganismos.

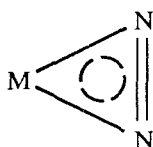
COMPLEJOS DE DINITROGENO

Recién en 1965 fue caracterizado por Allen y Senoff [2] el primer complejo de coordinación con la molécula de nitrógeno como ligando. A partir de entonces se han estudiado varias decenas de ejemplos más, y han sido propuestas cuatro posibles formas de enlace:



"end-on" terminal

1



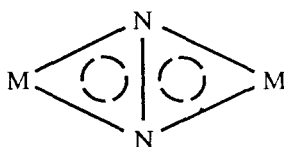
"side-on" terminal

3



"end-on" puente

2



"side-on" puente

4

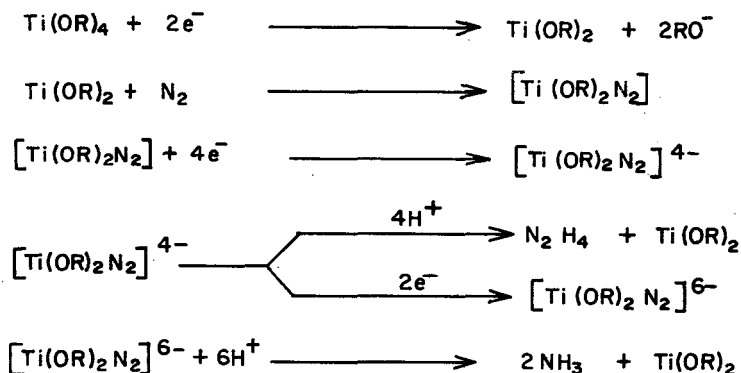
Las formas estructurales 1 y 2 son las más comunes, y ya han sido publicadas detalladas revisiones sobre la química de los compuestos de dinitrógeno [3, 4]. Baste mencionar que en este tipo de complejos el metal central casi

siempre se encuentra en un estado de oxidación muy bajo, lo que permite una retrodonación electrónica más efectiva hacia la molécula de N_2 que, al estado libre, es de por sí apolar y muy inerte.

FIJACION DEL NITROGENO *in vitro*

El descubrimiento de que el nitrógeno molecular podía formar complejos estables con metales de transición dio lugar a amplias investigaciones sobre la posibilidad de fijación del nitrógeno mediante dichos complejos.

Entre los diversos sistemas investigados, el que emplea titanio (II) fue el primero en dar resultado. Los alcóxidos de titanio (II) forman complejos de dinitrógeno que entonces pueden ser reducidos, con la subsecuente liberación de amoníaco o de hidracina, según la siguiente serie de reacciones [5]:



Un modelo más próximo a la nitrogenasa es el sistema de Schrauzer [6]. Se compone de un complejo de Mo con cisteína, tioglicol u otro tiol, FeSO_4 y un agente reductor, tal como BH_4^- o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. El sistema puede reducir al acetileno, N_2 , N_3^- , N_2O y RNC , los cuales son todos sustratos que la nitrogenasa también reduce. Se ha encontrado que la combinación del molibdeno y el hierro es muy específica en su acción y el mecanismo propuesto incluye un acetileno coordinado lateralmente al molibdeno según el tipo π -olefina.

También han sido estudiados complejos del tipo $[\text{M}(\text{N}_2)_2(\text{PR}_3)_4]$, donde $\text{M} = \text{Mo}$, W , y $\text{R} = \text{Me}_2\text{Ph}$, que reaccionan con ácido sulfúrico en metanol para formar un mol de N_2 y, a lo sumo, 2 moles de NH_3 por mol de complejo. Aunque los rendimientos de NH_3 no son de momento halagadores, se piensa que se está en el camino a la comprensión, aunque sea parcial, de los fenómenos que ocurren en la nitrogenasa.

FIJACION DEL NITROGENO in vivo

Las investigaciones bioquímicas en torno a la fijación del nitrógeno in vivo se centran en la preparación y caracterización de las proteínas de la nitrogenasa, la metaloenzima que cataliza el proceso, y en la investigación del mecanismo de su función.

Hay varias bacterias y algas azul-verdosas que pueden fijar el nitrógeno molecular, tanto especies de vida independiente como simbióticas. Entre las bacterias mejor estudiadas se encuentra la anaeróbica *Clostridium pasteurianum*, la aeróbica facultativa *Klebsiella pneumoniae* y la aeróbica *Azotobacter vinelandii*, aunque la nitrogenasa se ha logrado aislar de cerca de 20 microorganismos.

Se ha observado que los microorganismos fijadores de N_2 pueden excretar hasta el 80% del nitrógeno que asimilan [1] en forma de diversos compuestos utilizables por las plantas superiores, tales como NH_3 , derivados de hidroxilamina, aminoácidos, péptidos, etc.

La nitrogenasa.-

Es improbable que los sistemas de las nitrogenasas de todos los microorganismos fijadores de N_2 sean idénticos, pero ya desde el año 1930 se sospechaba que el molibdeno no sólo era constituyente de ellas, sino un elemento esencial para la fijación biológica del nitrógeno.

La nitrogenasa consiste fundamentalmente de dos proteínas de hierro-azufre y un cofactor, que es un complejo organometálico que activa la enzima, y se describen brevemente a continuación.

1. El componente mayor, llamado "Proteína Mo-Fe", con un peso molecular de alrededor de 220000, contiene, además de 2 átomos de Mo y entre 20 y 32 de Fe, un número variable (pero siempre cercano al de átomos de Fe) de aniones sulfuro lábiles, que probablemente actúan como puentes entre metales. Por lo menos la mitad de los átomos de Fe se encuentra formando cúmulos metálicos Fe_4S_4 del tipo ferredoxina (Figura 2), según se ha determinado por estudio de espectroscopía Mössbauer y de resonancia paramagnética electrónica (RPE).
2. La proteína menor, llamada "Proteína Fe", con un peso molecular cercano a 57000, contiene 4 átomos de Fe y 4 átomos de azufre lábil, también dispuestos en un cúmulo Fe_4S_4 del tipo ferredoxina, y ningún átomo de molibdeno.

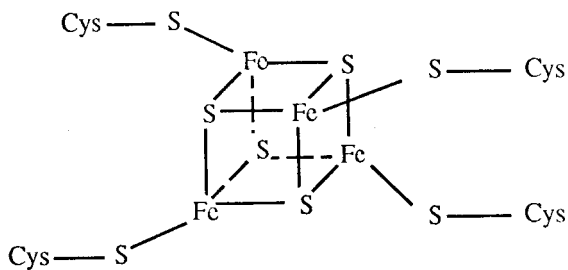
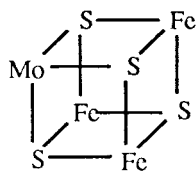


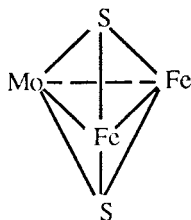
Figura 2: Estructura de la unidad $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{Cys})_4$ (Cys = cisteína)

3. El cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co) es un pequeño cúmulo disociable con composición aproximada $\text{MoFe}_{6-7}\text{S}_{8-10}$ y, según una comunicación reciente [7], parece ser el lugar en el cual se produce la reducción del nitrógeno molecular.

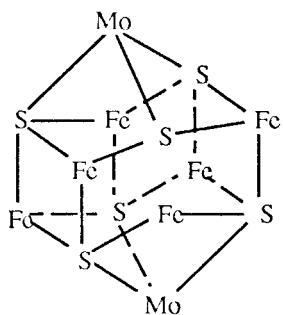
A pesar de múltiples estudios, la estructura exacta del cofactor Fe-Mo constituye uno de los mayores problemas aún sin solución en la Química Bioinorgánica contemporánea. Ninguno de los muchos esfuerzos realizados por producir análogos sintéticos ha resultado en la preparación de cúmulos con la estequiometría correcta, aun cuando varios cúmulos de Mo-Fe-S han sido sintetizados. Entre éstos se tiene al MoFe_3S_4 tipo "cubano", a una unidad MoS_2Fe_2 con puente triple, a cúmulos $\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_6$ en forma de hexámeros con "doble sombrero" y, más recientemente [7], al cúmulo $[\text{MoFe}_6\text{S}_6(\text{CO})_{16}]^{2-}$, que tiene la composición más próxima a la del cofactor lograda hasta ahora (Figura 3).



MoFe_3S_4



MoS_2Fe_2



$\text{Mo}_2\text{Fe}_6\text{S}_6$

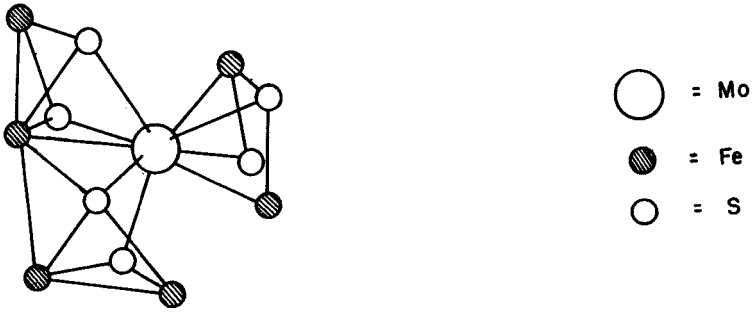


Figura 3: Algunos cúmulos de Mo-Fe-S.

La acción de la nitrogenasa.-

Con la certeza de que un átomo de molibdeno, sea en la "Proteína Mo-Fe" o en el cofactor Fe-Mo, constituye el centro activo donde la molécula de nitrógeno se reduce a amoníaco, aparentemente la proteína pequeña ("Proteína Fe") cumple la función de transportar los electrones desde el agente reductor hacia el centro activo de la enzima.

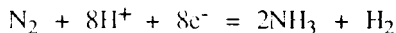
Bajo condiciones de laboratorio el agente reductor es normalmente el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (pero también se ha empleado KBH_4) y la hidrólisis de la sal monomagnésica de ATP a ADP y fosfato inorgánico proporciona la energía necesaria para cada etapa de transferencia de electrones.

Después de una serie de etapas de transferencia de electrones y de protones del agua al dinitrógeno que se reduce, las proteínas se regeneran a sus estados de oxidación originales.

En cuanto al mecanismo de la reducción del dinitrógeno por la nitrogenasa, no se han detectado intermediarios en esta reacción, pero un interesante fenómeno observado sugiere que la diimina, $\text{NH}=\text{NH}$, se produce durante el proceso.

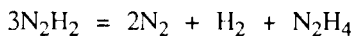
El fenómeno consiste en la evolución de hidrógeno molecular, lo que ocurre aun si la reacción se lleva a cabo bajo presión saturada de N_2 . Como la evolución de H_2 es completamente inhibida por el acetileno, se concluyó que alrededor del 75% de los electrones disponibles se utilizan para la reducción del N_2 y el resto producen H_2 .

Por tanto, considerando la evolución de hidrógeno junto con la reducción de N_2 , la estequiometría correcta de la reacción global sería:

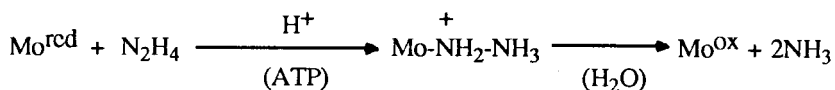


Por otro lado, como la reducción del acetileno por la nitrogenasa da únicamente etileno, es plausible asumir que la reducción de la especie isoelectrónica N_2 produzca diimina como primer intermedio, tal como ya lo postulaba H. Wieland en 1922 [8].

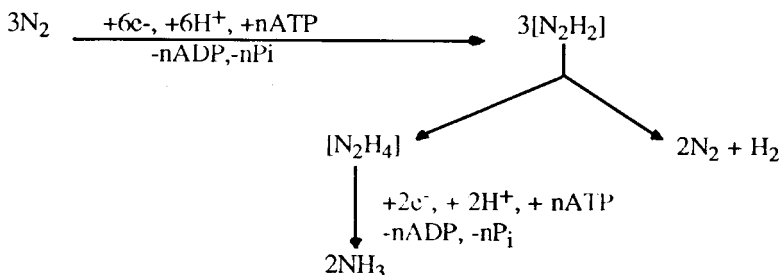
La diimina en medio ligeramente básico y temperatura ambiente se descompone espontáneamente:



Sin embargo, la hidracina producida es reducida y esta reacción aparentemente es catalizada por la forma reducida de la especie de Mo activa (sea la "Proteína Mo-Fe" o el cofactor) y estimulada por el ATP, como se ve en la siguiente ecuación:



Como resumen, la reducción del nitrógeno molecular puede seguir el siguiente esquema:



REFERENCIAS

1. Kleiner, D. (1975) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **14**, 80.
2. Allen, A.D. y Senoff, C.V. (1965) *Chem. Commun.*, 621.
3. Dilworth, J.R. y Richards, R.L. (1982) "Reactions of Dinitrogen Promoted by Transition Metal Compounds" en **Comprehensive Organometallic Chemistry** vol. VIII (Wilkinson, G., Stone, F. G. A. y Abel, E.W., eds), Pergamon Press Ltd., Oxford.
4. Chatt, J., Dilworth, J.R. y Richards, R.L. (1978) "Recent Advances in the Chemistry of Nitrogen Fixation", *Chem. Rev.*, **78**, 589.
5. Huhecy, J.E. (1981) **Química Inorgánica**, Harla, México D.F., p. 812.
6. Ochiai, E. (1985) **Química Bioinorgánica**, Reverté, Barcelona, p. 295.
7. Eldredge, P.A., Bryan, R.F., Sinn, E. y Averill, B.A. (1988) *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5573.
8. Schrauzer, G.N. (1975) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **14**, 514.