**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CÍCERO ALVES LIMA JUNIOR

**RITMOS CIRCADIANOS EM *Gracilaria birdiae*
(RHODOPHYTA): OSCILAÇÃO DO DESEMPENHO
FOTOSSINTÉTICO E CARACTERIZAÇÃO
ENZIMÁTICA DA NITRATO REDUTASE.**

Versão corrigida da Dissertação defendida

São Paulo

10/01/2013

CÍCERO ALVES LIMA JUNIOR

**RITMOS CIRCADIANOS EM *Gracilaria birdiae*
(RHODOPHYTA): OSCILAÇÃO DO DESEMPENHO
FOTOSSINTÉTICO E CARACTERIZAÇÃO
ENZIMÁTICA DA NITRATO REDUTASE.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof . Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo
2012

***Dedico esta dissertação aos meus pais Cícero e Eurídice
que dedicaram suas vidas à minha.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador Pio Colepicolo pela disponibilidade incondicional, paciência, tolerância, liberdade e confiança.

Às professoras Dr^a Eliane Marinho-Soriano e Nair Yokoya pelo fornecimento das linhagens de *Gracilaria birdiae*.

À professora Mirian Marques pela rápida, porém muito densa e estimulante conversa sobre ritmos circadianos.

Aos meus familiares Isa, Laís, João Carlos, Luci, Saboia (*in memoriam*), Vitória, Celso e Samuel pelos conselhos e carinho.

Aos amigos de república André, Maurício, Tibério, Valdir e Vinícius pela convivência, conselhos e momentos de descontração essenciais à minha formação.

Aos amigos e colegas de laboratório Aline, Ângela, Cintia, Dina, Ed, Eliezer, Erechim, Erika, Helena, João, Leonardo, Luiz, Luiza, Renato, Sandra, Tati e a outros tantos de diversos laboratórios da USP pela convivência científica e pessoal.

Aos amigos de graduação Alex, Caio, Eulália, Eliza, Jair, Geison, Nayara e Ronny pela companhia e amizade constante.

Às agências financiadoras FAPESP, CNPq, CAPES e MCTI por me fornecerem bolsas e financiamento.

***...a rose is not necessarily and unqualifiedly a rose... it is a very
different biochemical system at noon and at midnight.
— Colin Pittendrigh, 1965.***

***Little by little the night turns around
Counting the leaves which tremble at dawn
Lotuses lean on each other in yearning
Under the eaves the swallow is resting***

***Set the controls for the heart of the sun
— Pink Floyd, 1968***

RESUMO

(Alves-Lima, C). **RITMOS CIRCADIANOS EM *Gracilaria birdiae* (RHODOPHYTA): OSCILAÇÃO DO DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA NITRATO REDUTASE.** 2012. 75p. Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os ritmos circadianos coordenam grande parte dos mecanismos fisiológicos, principalmente no metabolismo do nitrogênio, inclusive a assimilação do nitrato, que é a forma de nitrogênio mais incorporada pelos organismos fotossintéticos marinhos. Sua assimilação é feita pela enzima nitrato redutase (NR) que é regulada de forma sistêmica e em vários níveis: transcricional, pós-transcricional e pós-traducional. Tal modulação é exercida por diversos fatores como nitrato, luz, glutamato, quinases e por fatores de transcrição centrais do ritmo circadiano. A fotossíntese fornece os esqueletos de carbono e poder redutor para a incorporação do nitrogênio na síntese de glutamato. *Gracilaria birdiae* é uma macroalga endêmica do litoral brasileiro e ainda precisa de mais estudos em fisiologia, apesar da sua grande importância econômica. Este estudo desenvolveu um novo protocolo para o ensaio em larga escala da atividade enzimática da NR e analisou a oscilação do desempenho fotossintético ao longo do dia em *G. birdiae*. A alga, proveniente do Rio Grande do Norte, foi isolada a nível unialgal e apresentou uma taxa de crescimento relativo diário de 6,5% em laboratório. O novo protocolo descrito propõe as seguintes adaptações: amostragem de 20 mg de biomassa algal em vez de 100 mg, extrato bruto com 100 μL em vez de 1 mL, ensaio enzimático de 50 μL e parada da reação com sulfanilamida em vez de EtOH/ ZnSO_4 . Estas modificações permitem o ensaio enzimático da NR semi-purificada de 8 testes com réplicas experimentais e biológicas e controle negativo (96 ensaios no total) em 3 horas. A caracterização enzimática demonstrou os seguintes parâmetros ótimos para atividade máxima: tampão fosfato pH 8, temperatura 25°C, 60 minutos de incubação, 1,25 mMol de nitrato e 50 μMol de NADH. A atividade máxima de $5,4 \pm 0,7 \text{ nMol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas e o K_M $6 \pm$

2,2 $\mu\text{Mol.L}^{-1}$ para NADH e de $109 \pm 11 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ para o nitrato. A enzima não apresentou atividade na presença de NADPH e demonstrou atividade 48 vezes maior que no protocolo inicial. Descrevemos um método preciso e reprodutível para análise em larga escala da atividade da NR que pode ser utilizado em estudos comparativos de cinética enzimática da NR de diferentes espécies ou em estudos de ritmos biológicos. A análise do desempenho fotossintético, feita em coletas de 15 mg de alga, foi caracterizada pela fluorescência da clorofila, demonstrando os seguintes parâmetros máximos: taxa de transporte de elétrons relativa (rETR) de $15,29 \mu\text{Mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, eficiência fotossintética (alfa) de 0,37 fótons/elétrons, irradiância de saturação (I_K) foi de $41,32 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e houve fotoinibição a partir de $300 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Apenas o parâmetro alfa apresentou oscilação significativa em claro constante e manteve o período de 24 horas, apesar de ter diminuído sua amplitude em 50%. Isso pode ser devido a um controle pelo mecanismo central dos ritmos circadianos sobre proteínas ou pigmentos ligados ao fotossistema II, influenciando na capacidade de transformação de fótons em elétrons. Paralelamente, a aclimação da alga à luz constante pode ter levado a uma queda na produção de pigmentos e fotoxidação, justificando a queda nos valores médios de alfa. *G. birdiae* é uma alga com grande importância econômica e ecológica e este estudo, ligado a outros trabalhos de fisiologia, confirma seu grande potencial para estabelecimento como organismo modelo para estudos fisiologia e fotossíntese.

Palavras-chave: Cronobiologia; Macroalga, Nitrato, Assimilação, Fotossíntese, Nitrato Redutase.

ABSTRACT

(Alves-Lima, C) **CIRCADIAN RHYTHMS IN *Gracilaria birdiae* (RHODOPHYTA): OSCILLATION OF PHOTOSYNTHETIC PERFORMANCE AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF NITRATE REDUCTASE.** 2012. 75p. Master's Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Circadian rhythms control most of physiological processes, including nitrate assimilation. This nutrient is the most incorporated form of nitrogen by marine plants and its assimilation is made by the nitrate reductase enzyme (NR) that is highly regulated in all levels expression, since mRNA transcription until protein degradation. Many factors coordinate this regulation, including the nitrate itself, light glutamate, kinases and by transcription factors of the central oscillator of the circadian rhythms. Photosynthesis also plays an especial role in NR regulation through carbon skeleton and NADPH synthesis that allows the last step of nitrate assimilation: glutamate synthesis. *Gracilaria birdiae* is an endemic marine rhodophyte from Brazil that still lacks physiological and molecular studies despite its extensively exploitation for agar-agar extraction. This study aimed the development of a large scale enzymatic assay of NR (NRA) and the analysis of daily oscillation of photosynthesis performance for *G. birdiae*. The algae, collected ant Rio Grande do Norte state, was isolated to a unialgal level and presented an average of relative daily growth rate of 6.5% in laboratory. The new protocol here described proposes the following adaptations for NRA: sampling of 20 mg instead of 100 mg, 100 μL of crude extract rather than 1 mL, NRA in 50 μL in place of 1 mL and reaction stop with sulphanilamide instead of an EtOH/ ZnSO_4 system. These changes allow the assay of the semi-purified NR of 24 samples all with its experimental and biological triplicates and negative control in 3 hours. Phosphate buffer at pH 8, 25°C, 60 minutes of incubation, 1.25 mMol of nitrate and 50 μMol of NADH. The maximum activity was $5.4 \pm 0.7 \text{ nMol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ of protein and a K_M of $6 \pm 2.2 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ for NADH and of $109 \pm 11 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ for nitrate. NR didn't show any activity in the presence of only NADPH as the

electron donor and showed and 48 times greater activity in the new protocol, compared to the old one. We describe here an accurate and reproducible method for large scale NRA that can be used in comparative studies of NR kinetics or in biological rhythms of NR. The analysis of photosynthetic performance, made in 15 mg sampling of algal biomass, was characterized through chlorophyll fluorescence, revealing the maximum values of these parameters: relative electrons transfer rate (rETR) of 15,29 $\mu\text{Mol electrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, photosynthetic efficiency (the alpha parameter) of 0,37 photons/electrons, the saturating irradiance (I_K) was 41.32 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and there was photoinhibition below the irradiance of 300 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The only variable that oscillated during the continuous light experiment and maintained the 24-hour period was the Alfa parameter, besides its 50% lower amplitude. This oscillation can be due to an endogenous control of the central circadian oscillator into proteins or pigments bound to the photosystem II, influencing the capacity of photon-electron transformation. At the same time, the acclimation to constant light could have driven the algae to a damping of pigment production and photooxidation, what explains the fall of alpha average values. *G. birdiae* is an alga with great economic and ecological relevance and this study confirms the potential for its establishment as a model organism.

Keywords: Chronobiology; Macroalgae, Nitrate, Assimilation, Photosynthesis, Nitrate reductase

LISTA DE SIGLAS

ACT - Actina
ADP – Adenosina difosfato
SA - Sulfanilamida
ATP – Adenosina trifosfato
BSA – Albumina sérica bovina
cAMP – Adenosina monofosfato cíclica
CCA1 – Proteína *Circadian Clock Associated 1*
CRY1-2 – Criptocromo 1,2 e 3
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DTT - Ditionitrito
EB_(F) – Extrato Bruto (Filtrado)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético
EF-1 α – *Elongation Factor 1 alfa*
F'_M – Fluorescência máxima
F_o - Fluorescência basal
FSI-II – Fotossistemas 1 e 2
F_T – Fluorescência transitória
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
GI – Proteína *Gigantea*
Gln – Glutamina
Lhcb – *Light Harvesting Complex B*
LHY – Proteína *Late Elongated Hypocotyl*
MoCo – Cofator molibdopterina
MOT1 – Transportador de molibdênio 1
MYB – Domínio proteico de fatores de transcrição semelhantes ao protooncogene *myb*
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NED - n-1 Naftil-etilenodiamina diidrocloreto
NPQ – Non-photochemical quenching – Extinção não fotoquímica
NR – Nitrato redutase
PAM – Pulso de amplitude modulada
PAR – *Photosynthetic Active Radiancance* – Radiação fotossintética ativa
PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase
PFD – *Photon Flux Density* – Densidade de fluxo fotônico
PHYA-E – Fitocromos A-E
PP2A1-2 – Proteína Fosfatase A 1 e 2
PRR – Domínio *Pseudo-Response Regulator*
qP – *Photochemical quenching* – Extinção fotoquímica
rETR – Taxa de transporte de elétrons relativa
RNA – Ácido ribonucleotídico
RPM – Rotações por minuto
RQE – Rendimento quântico Efetivo
TCRD – Taxa de Crescimento Relativo Diário
TOC1 – Proteína *Time of CAB 1*
ZTL – Proteína *Zeitlupe*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 RITMOS BIOLÓGICOS	12
1.2 ASSIMILAÇÃO DE NITRATO	18
1.3 FOTOSSÍNTESE	24
1.4 MACROALGAS	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Coleta e cultivo	32
3.2 Ensaio enzimático da NR.....	34
3.3 Fotossíntese	37
3.3 Planejamento experimental.....	38
3.4 Análise Estatística	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Obtenção do cultivo unialgal.....	40
4.2 Ensaio Enzimático da NR.....	44
4.3 Fotossíntese	60
5. CONCLUSÕES	73
6. APÊNDICES.....	74
6.1 EXPRESSÃO GÊNICA DA NR	74
6.1.1. Extração de ácidos nucleicos	74
6.1.2. PCR quantitativa.....	74
REFERÊNCIAS	79
8. CURRICULUM VITAE.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 RITMOS BIOLÓGICOS

Em 1729 o astrônomo francês Jean Jacques Ortous de Mairan observou que as folhas de uma planta similar a *Mimosa* possuíam um ritmo de abertura e fechamento de suas folhas ao longo do dia. Ao transferir a planta para o escuro, verificou que mesmo assim o ritmo continuava, ou seja, era independente da oscilação da iluminação do sol. Este experimento simples foi suficiente para que a cronobiologia, ou seja, o estudo sistemático da influência do tempo nos organismos, desse seus primeiros passos (HHMI, 2012; MARQUES et al., 1989).

Entretanto, apenas no fim da década de 1950 que os conceitos de “cronobiologia-circadiano” foram definidos. Neste hiato muitos pesquisadores, como Lineu e Darwin, contribuíram para a confirmação da existência de um mecanismo endógeno independente de qualquer fator abiótico e de sua hereditariedade (MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997). Aschoff, Brüning, Halberg e Pittendrigh podem ser considerados os fundadores da cronobiologia pela comprovação de diversos tipos de ritmos biológicos e seus mecanismos em plantas, insetos e mamíferos e por terem desenvolvido conceitos, terminologias e metodologias específicas para esta área (ASCHOFF, 1984; MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997).

A partir da década de 70, a cronobiologia se estabeleceu como um ramo científico muito polêmico e complexo, com diversos organismos modelo e terminologia própria. De forma simplificada, a base para iniciar um estudo nesta área é a detecção de processos rítmicos quando uma variável analisada persistir em livre curso, ou seja, mantiver sua periodicidade independente de seu correlato ambiental (*Zeitgebers*: controladores de tempo, em alemão. Termo criado por ASCHOFF em 1951). Além disso, deve existir uma compensação à variação de temperatura, ou seja, continuidade da periodicidade e amplitude

mesmo sob variações de 10°C (MARQUES et al., 1997). Entretanto, ainda não se entende bem como o mecanismo de controle do relógio pela temperatura está estruturado (GARDNER *et al.*, 2006).

Os ritmos biológicos são ubíquos e muito importantes para a sobrevivência de todos os seres vivos e vários tipos de oscilações com diferentes períodos já foram identificados e classificados. Ritmos circadianos, por exemplo, são aqueles que podem variar por 24 ± 4 horas. Os ritmos não circadianos podem ser: infradianos (menos de um ciclo por dia, maior que 28 horas), como os circasseptanos (que duram sete dias) e os circatrigintanos ou circamensais (cerca de 30 dias) e os ultradianos como os ciclos circamarés que se manifestam em dois pulsos em menos de 24 horas (MARQUES et al., 1997).

Dentro dessa grande diversidade de ritmos há uma característica em comum: a existência de mecanismos endógenos de controle de tempo que fornecem a vantagem adaptativa de sincronização e a antecipação de eventos ambientais. A sincronização faz com que diferentes sistemas reajam em conjunto para que o organismo se organize de forma integrada, consequentemente aumentando a eficiência das reações. Antecipar mudanças ambientais favorece o organismo no sentido de preparar mecanismos internos para responder a um estímulo periódico, como a luz. Como tal habilidade garante a adaptabilidade do organismo ao ambiente, sua importância na evolução é extremamente significativa (MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 1997).

No centro de todos os relógios biológicos existe, no mínimo, um oscilador bioquímico autônomo. Este oscilador contém elementos positivos e negativos que geram ciclos de retro-inibição e retro-ativação usados para formar circuitos de tempo (BELL-PEDERSEN *et al.*, 2005). Os componentes destes ciclos podem receber sinais diretos ou indiretos de fatores ambientais, permitindo a regulação do período e da fase do relógio biológico (BELL-PEDERSEN et al., 2005; LILLO; MEYER; RUOFF, 2001)

Em plantas terrestres, por exemplo, a indução de vias reguladas pela luz antes do amanhecer permite uma preparação para que a fase de luz tenha um aproveitamento completo, enquanto mecanismos de respostas ao estresse possam antecipar, por exemplo, a baixa disponibilidade de água no final da tarde. O agendamento de programas biológicos também pode permitir a separação temporária de reações incompatíveis (GARDNER *et al.*, 2006).

O detalhamento dos mecanismos do relógio central em plantas tem sido uma tarefa árdua quando comparada a outros modelos de eucariotos como *Neurospora* e *Drosophila*. Diversos fatos contribuem para essa dificuldade: plantas possuem menos tempo de estudos moleculares como organismos modelo, são muito sensíveis a oscilações de quantidade e qualidade de luz, suas estruturas moleculares divergem muito dos outros organismos já estudados e possuem múltiplos osciladores centrais. Todas essas características tornaram os estudos de ritmos em organismos fotossintetizantes uma linha de pesquisa muito interessante (DUNLAP; LOROS; DECOURSEY, 2004).

Resultados importantes foram obtidos em eucariotos fotossintetizantes como: *Gonyaulax* (hoje *Linguludinium*), *Euglena*, *Chlamydomonas* e *Acetabularia* (DRIESSCHE; BONOTTO, 1969; GOTO *et al.*, 1985; LOPES *et al.*, 2002; MORSE *et al.*, 1989). Desses estudos foi concluído que osciladores pós-traducionais também existem em eucariotos. A ocorrência de 2 osciladores independentes na mesma célula também foi demonstrada em *Gonyaulax*, que ainda é um mecanismo que precisa ser elucidado no âmbito molecular (ROENNEBERG; MORSE, 1993). Estudos em *Euglena* puderam comprovar que moléculas sinalizadoras como o cAMP são importantes na função dos relógios endógenos (CARRÉ; EDMUNDS, 1993). Com o desenvolvimento de ferramentas genéticas e disponibilização de genomas completos publicados de organismos como *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* ou *Arabidopsis thaliana* a cronobiologia começou a elucidar a arquitetura dos osciladores usando abordagens moleculares.

Nos anos 90, as cianobacterias surgiram como sistemas genéticos poderosos e permitiram o estudo de ritmos em escala celular. Uma rede regulatória baseada em 3 proteínas (KaiA, KaiB e KaiC) foi demonstrada como reguladora da transcrição em todo o genoma. A descoberta mais significativa foi que quando misturadas em um tubo com ATP essas proteínas demonstram um ritmo circadiano da fosforilação de KaiC, o primeiro mecanismo identificado de oscilação circadiana pós-traducional (NAKAJIMA *et al.*, 2005). Hoje, *Synechococcus elongatus* ainda é o melhor mecanismo para estudar a interação de mecanismos transcricionais/traducionais e pós-traducionais da oscilação circadiana.

Recentemente, um novo organismo modelo tem mostrado resultados muito promissores: a microalga *Ostreococcus tauri*. Esse organismo é considerado o menor eucarioto existente e possui diversas rotas bioquímicas simplificadas (OOIJEN *et al.*, 2012; O'NEILL *et al.*, 2011), apresentando um enorme potencial para a elucidação de mecanismos moleculares do relógio circadiano em eucariotos fotossintetizantes.

Um passo importante na elucidação desses mecanismos foi dado no estudo de GREEN; TOBIN (2002) onde foi comprovado em *Arabidopsis thaliana* que uma proteína codificada no núcleo, a CCA1, conferia a expressão rítmica de um gene do cloroplasto muito importante para a captação de luz (*lhcb*). Ao ser super-expressa, esta torna a expressão de *lhcb* arritmica, fato que levou CCA1 a ser considerada como um importante componente do oscilador central dos ritmos circadianos em plantas (ALABADÍ *et al.*, 2001).

CCA1 e LHY são fatores de transcrição que se ligam ao DNA através de domínios semelhantes à MYB. Essas proteínas demonstram características muito peculiares: sua afinidade pelo DNA pode ser regulada por fosforilação, agem como reguladoras negativas redundantes no ciclo do relógio central e possuem pico de expressão na primeira hora de luz (Figura 1). Nas últimas horas de luz, outro fator de transcrição, o TOC1, é expresso e regula positivamente os dois primeiros, através de ligação às regiões promotoras desses dois genes

por meio de domínios PRR de ligação ao DNA, fechando assim o ciclo de retroalimentação (DUNLAP; LOROS; DECOURSEY, 2004). De forma simplificada essas três proteínas compõem o oscilador central do ritmo circadiano que regula praticamente todos os processos bioquímicos em plantas superiores.

O mecanismo detalhado de sinalização da luz até o relógio central ainda não está bem esclarecido em eucariotos fotossintetizantes devido a sua grande complexidade. Sabe-se que em plantas a luz é percebida por cinco tipos diferentes de fitocromos (PHYA-E) e dois criptocromos (CRY1 e 2) que se diferenciam pela capacidade de captação de diferentes comprimentos de onda e intensidades. Estes fotorreceptores desencadeiam subsequentes fosforilações e consequente ativação de genes que culminam na rápida síntese de CCA1 e LHY que podem tanto inibir TOC1 quanto estimular processos controlados por ritmo como respostas ao stress, desenvolvimento e metabolismo (DUNLAP, 1999; GARDNER *et al.*, 2006).

Estudos comparativos em eucariotos fotossintetizantes mostram que existe alta conservação nos componentes homólogos do oscilador central do relógio. Entretanto, quando comparados com as algas verdes *C. reinhardtii* e *O. tauri* só há similaridade entre os genes fotorreceptores, fosfoquinases e os domínios de ligação ao DNA: MYB e PRR (HOLM *et al.*, 2010). Assim como as algas verdes, a briófito *Physcomitrella patens* demonstrou menor complexidade e alto potencial para elucidação de mecanismos de regulação do oscilador central assim como a evolução de seus componentes (HOLM *et al.*, 2010). O estudo em organismos mais basais pode ajudar na elucidação de vias regulatórias muito importantes que são mascaradas pela complexidade sistêmica de plantas mais derivadas evolutivamente.

Figura 1 – Modelo simplificado do oscilador central do relógio circadiano de plantas. O primeiro ciclo de retroalimentação identificado, o ciclo A, consiste de fatores Myb-like ativos na aurora: CCA1 (*Circadian Clock Associated 1*) e LHY (*Late Elongated Hypocotyl*), os quais regulam negativamente a expressão de TOC1 (*Timing Of Cab Expression 1*). Evidências sugerem que este último ativa direta ou indiretamente a proteína X, um fator ainda não identificado que induz a expressão de CCA1 e LHY. Supõe-se que o ciclo B é composto de dois ou mais genes regulados no crepúsculo (*dusk*), outro fator desconhecido Y e TOC1. O ciclo C consiste de genes regulados ativados na aurora (*dawn*): PRR (*Pseudo-Response Regulator*) 7 e 9, CCA1 e LHY. Modificações pós-traducionais também são de extrema importância para o funcionamento do relógio (ciclo D). ZTL (*Zeitlupe*) regula a abundância TOC1; e sua atividade é regulada por GI (*Gigantea*) e PRR3. (adaptado de HARMER, 2009)

1.2 ASSIMILAÇÃO DE NITRATO

O nitrogênio disponível na atmosfera está na forma de nitrogênio gasoso (N_2), o qual é inacessível à maioria dos organismos, com exceção de algumas bactérias que realizam sua fixação pela enzima nitrogenase de forma eficiente a mais de 3 bilhões de anos (HOWARTH; MARINO; LANE, 1988; LATYSHEVA *et al.*, 2012). Entretanto, o nitrato (NO_3^-) é a forma mais abundante de nitrogênio tanto nos solos quanto no mar (KROUK *et al.*, 2010; TYRRELL, 1999). Assim, muitas espécies tiveram que desenvolver outras estratégias de captação e assimilação desta forma mais disponível de nitrogênio.

O nitrato pode ser captado pelas células para assimilação, para armazenamento em tonoplastos ou para sua distribuição entre diferentes tecidos. Existem duas famílias de transportadores de nitrato: os transportadores simporte e antiporte acoplados a prótons. Para cada evento de captação de nitrato existem vários subtipos destes transportadores que podem ter sua atividade e síntese regulada pela própria disponibilidade de nitrato, ritmos circadianos, pH e disponibilidade de aminoácidos e açúcares (KROUK *et al.*, 2010).

O próprio nitrato funciona como molécula sinalizadora de diversos processos, atuando como mediadora de cascatas de sinalização e da transcrição gênica. Em plantas coordena a dormência de sementes, floração, arquitetura de raízes e movimento de folhas. Sensores de nitrato, como CHL1 e NRT2.1, tem sua afinidade modificada por fosforilação, podendo gerar respostas à uma grande variação de nitrato no meio (KROUK *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2007; ORSEL *et al.*, 2002).

Após ser captado pelas células, o nitrato é reduzido no citoplasma pela nitrato redutase (NR) que usa NAD(P)H como fonte de elétrons, formando o nitrito que, por sua vez, é convertido em amônia NH_4^+ pela nitrito redutase no cloroplasto. Seguindo a via, a amônia é condensada ao α -cetoglutarato, em uma reação catalisada pela glutamato sintase, originando o glutamato (CRAWFORD, 1995).

Após sua formação, o glutamato terá seu grupo amino transferido para um α -cetoácido, através de uma aminotransferase específica. Dessa forma, origina um novo aminoácido e um α -cetoglutarato e, assim, o nitrogênio inorgânico entra na síntese de aminoácidos que são as unidades básicas para a formação de todas as proteínas e de diversas outras macromoléculas (NELSON; COX, 2008).

Um destes aminoácidos pode ser a glutamina (gln), originada pela glutamina sintetase. Por um mecanismo de retroalimentação negativa, ao ser acumulado este aminoácido pode reprimir diretamente da NR, fato comprovado pela observação da oscilação reversa de gln e do mRNA de NR em plantas terrestres (DENG *et al.*, 1991; SCHEIBLE *et al.*, 1997).

Em plantas, a NR tem uma estrutura homodimérica como monômeros de cerca de 110 kDa. A dimerização é um passo vital para a funcionalidade da enzima, podendo também demonstrar uma tendência de formação de homotetrâmero, processo que não possui tanta influencia na atividade (CAMPBELL, 2001), mas que pode ser a forma mais encontrada da enzima (LOPES; OLIVEIRA; COLEPICOLO, 2002; VELASCO *et al.*, 1989). Possui sempre três grupos prostéticos: FAD, Ferro-heme b_{557} e co-fator de molibdênio, o MoCo. Este cofator é formado por uma pterina alquilada não completamente aromatizada complexada com um átomo de molibdênio através de um agrupamento ditioleno ligado ao quarto carbono de sua cadeia lateral (Figura 2), esta estrutura central, chamada molibdopterina, é altamente conservada e está presente em todas as enzimas dependentes de molibdênio. Como este metal está diretamente ligado ao sitio ativo da enzima, sua importância é fundamental para a funcionalidade da assimilação do nitrato (ATAYA *et al.*, 2003). Transportadores específicos para o molibdato existem como o MOT1, que possui alta afinidade pelo seu substrato (FERNANDEZ; GALVAN, 2008) contribuindo para a sobrevivência de plantas já que sua disponibilidade no meio é muito baixa (MENDEL, 2011).

Figura 2 – A) Assimilação de nitrato em uma célula vegetal. O nitrato é retirado do meio e pode ser estocado nos vacúolos ou ser assimilado. Seu excesso pode ser transportado para tecidos adjacentes por transportadores específicos. A primeira redução ocorre no citoplasma e depois o nitrito é transferido para os cloroplastos onde há uma segunda redução no íon amônio (NH_4^+), a partir do qual os aminoácidos são formados. O transporte de H^+ para fora das células se procede via uma H^+ -P-ATPase. B) Estrutura planar do cofator chamado molibdopterina indicando a pterina e o estado de oxidação do átomo de molibdênio com o qual o nitrato reage. Adaptado de HELDT; PIECHULLA (2011).

Existe uma incrível variação na massa molecular relativa de NRs de diferentes espécies, assim como no seu tamanho e na sequência das subunidades peptídicas, resultando numa ampla variedade de formas estruturais desta enzima (SOLOMONSON; BARBER, 1990). Exemplos da influencia da variedade estrutural na regulação diferencial da NR é a presença de uma sequência de aminoácidos numa região espaçadora dos domínios MoCo e o heme, chamada *Hinge 1*. Em plantas essa região possui um resíduo de serina fosforilável que permite a ligação da proteína 14-3-3 que inibe sua atividade (FISCHER et al., 2005; WEINER; KAISER, 2001). Outro exemplo é a presença de uma região de aminoácidos ácidos extremamente variável entre grupos de organismos localizada a N-terminal do domínio MoCo. Esta sequência de 7 a 21 aminoácidos em fungos e de 60 a 99 em plantas está sujeita à regulação pós-traducional provavelmente por fosforilação ou degradação por proteases (NUSSAUME *et al.*, 1995).

As diversas isoformas da NR podem estar relacionadas tanto à sua especificidade pelo doador de elétrons (NAD(P)H) quanto pela afinidade pelo nitrato. Não existe uma classificação definida que separe grupos de organismos de acordo com o tipo de NR, mas sabe-se que ela pode ser específica para NADH, específica para NADPH ou bi-específica (HOFF; STUMMANN; HENNINGSEN, 1992), sendo esta a principal característica funcional para classificar as NRs (CAMPBELL, 2001).

A regulação da NR é um processo bastante complexo (Figura 3) e muito estudado. Como a NR catalisa a primeira reação, a via de assimilação do nitrato é regulada principalmente nesta enzima. Os níveis de NO_3^- constituem o sinal primário de regulação positiva, mas a luz, CO_2 , fosforilação e produtos do metabolismo do nitrogênio e da glicose também atuam como reguladores. Basicamente a regulação da NR tem que ser eficiente a ponto de controlar 3 processos:

Figura 3 – Regulação da NR. A síntese proteica é estimulada por carboidratos (provavelmente glicose) e luz, e inibida por glutamina e outros aminoácidos. A recém-formada NR é degradada em poucas horas. Também pode ser inibida por fosforilação de um resíduo de serina e sua subsequente ligação a uma proteína inibidora. Após a liberação hidrolítica do resíduo de fosfato por uma fosfatase, o inibidor é dissociado e a atividade volta ao normal. Existe um equilíbrio dinâmico entre as formas ativa e inativa da enzima. A atividade da NR quinase é inibida por produtos da fotossíntese, como trioses-fosfato e outros ésteres de fosfato, deixando NR ativa. Modificado de HELDT e PIECHULLA (2011).

- a) Sincronização da assimilação de CO_2 e NO_3^- ;
- b) Redução de nitrato suficiente para suprir a demanda por aminoácidos;
- c) Prevenção do acúmulo de NO_2^- , que é altamente tóxico.

A redução de nitrato teoricamente pode seguir na ausência de luz, devido a sua dependência apenas de NADH que pode ser fornecido pela respiração. Já a redução do nitrito em amônia depende de NADPH que provem, em sua grande maioria, da fotossíntese, sendo assim pouco provável seguir no escuro. Então, durante a noite, pode-se formar um quadro de acúmulo de quantidades tóxicas de nitrito, caso a inibição da NR não funcione (HELDT e PIECHULLA, 2011). Dada sua importância no desenvolvimento e fisiologia geral, a regulação da NR deve funcionar de forma sistêmica em todos os níveis: transcricional, pós-transcricional e pós-traducional (CRAWFORD, 1995; LILLO *et al.*, 2004).

Apesar de diversos fatores influenciarem na regulação da NR, o relógio biológico parece ser determinante na sua expressão basal. Em ciclos alternados de claro/escuro e claro constante, já foi identificada a presença de uma ritmicidade circadiana em diferentes espécies de eucariotos fotossintetizantes, incluindo macroalgas (DAVISON, 1984; GRANBOM *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 1997, 2002). Entretanto, CHOW *et al.* (2004) mostrou que em *Gracilaria chilensis* a atividade de NR parece ser mais sensível às variações de luz do que ao relógio biológico, fato que justifica maiores esclarecimentos em estudos no mecanismo da regulação da assimilação do nitrato.

O conhecimento detalhado do metabolismo do nitrogênio permite que diversas espécies de vegetais tenham sua fisiologia evidenciada e comparada, permitindo que se conheça mais a respeito do ciclo biogeoquímico deste elemento limitante, subsidiando pesquisas sobre manejo, ecologia e cultivo de plantas úteis ao homem visando um aprimoramento nos cultivos (SOLOMONSON; BARBER, 1990b).

1.3 FOTOSSÍNTESE

As reações diretamente dependentes da luz na fotossíntese resultam na produção de ATP e NADPH que são utilizados na síntese de açúcares nas reações de fixação do carbono, as quais ocorrem no estroma do cloroplasto, região que circunda os tilacóides. A energia luminosa é absorvida por meio dos fotossistemas 1 e 2 (FSI e FSII), de forma que a luz impulsiona a transferência de elétrons por vários compostos que no final reduzem NADP^+ a NADPH e oxidam a H_2O em $\text{H}_2 + \text{O}_2$. Essa movimentação de elétrons, análoga à cadeia de transporte de elétrons da respiração, também é usada para gerar o gradiente de prótons através da membrana do tilacóide, sendo a força motora da síntese de ATP (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A transferência de elétrons através de carregadores ligados à membrana, como citocromos, quinonas e proteínas com domínio ferro-enxofre, resulta na criação de um potencial de membrana devido à movimentação de íons H^+ para o espaço intermembranar dos cloroplastos. Este potencial fornece energia suficiente para promover a formação de ATP pelas ATPases, processo também chamado de fotofosforilação (TAIZ; ZEIGER, 2006). Esta etapa diretamente dependente da luz promove a transformação de energia luminosa em química nas ligações fosfoanidrido do ATP e no potencial redutor do NADPH. Como tais moléculas são usadas imediatamente, o estoque de energia deve ser feito sobre outras formas. A assimilação de CO_2 e o ciclo das pentoses-fosfato tem esse papel na fotossíntese de promover o acúmulo de energia em ligações covalentes, como as da glicose. A síntese de carboidratos para acúmulo de energia também ocorre em animais, como na gliconeogênese, mas nunca com a incorporação e saldo líquidos de CO_2 como na fotossíntese (MARZZOCO; TORRES, 2007; NELSON; COX, 2008).

A grande vantagem deste mecanismo de geração de energia está na capacidade do cloroplasto de captar luz. O principal fotorreceptor na fotossíntese é a clorofila. É um tetrapirrol cíclico derivado da protoporfirina IX que possui um dos maiores coeficientes de

extinção molar conhecidos para moléculas orgânicas (VOET; VOET, 2006). Centenas de clorofilas captam fótons e os transferem, via excitação sequencial, até um par especial de clorofilas localizado no centro de reação do fotossistemas que é oxidado e transfere um elétron para os carreadores de elétrons da fotossíntese. Essa conversão fótons em elétrons se chama etapa fotoquímica (VOET; VOET, 2006).

Se a transferência de excitação não atingir os centros de reação, as clorofilas podem emitir fluorescência que pode ser estimada através de fluorímetros. A eficiência da fluorescência (medida pela razão entre a luz incidida e a emitida) evidencia indiretamente processos que informam o estado do aparato fotossintético como o aumento da perda por calor, chamada de extinção não-fotoquímica (*non-photochemical quenching* – NPQ), que é relativa à dissipação de energia luminosa não absorvida pelos fotossistemas. Quando se aplica um pulso rápido e de baixa intensidade, todo aparato fotossintético se torna excitado e a NPQ pode ser considerada desprezível, resultando em um rendimento máximo da fluorescência (F_m) (BAKER, 2008; BEER; AXELSSON, 2004; MAXWELL; JOHNSON, 2000; WHITE; CRITCHLEY, 1999). Comparando-se F_m com o rendimento da fluorescência normal (F_t) é possível calcular o rendimento quântico efetivo do fotossistema 2 (Φ_{FSII}) e a taxa de transporte de elétrons relativa (*relative electron transfer rate* – rETR) de acordo com e com a densidade de fluxo de fótons (*photon flux density* – PFD) incidida sobre a planta, como mostram as seguintes equações:

$$\Phi_{FSII} = \frac{F'_m - F_t}{F'_m}$$

e

$$rETR = \frac{\Phi_{FSII} \cdot PFD}{2}$$

A divisão por dois considera que a luz incidida é dividida igualmente entre o FSII e o FSI (BAKER, 2008; MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Estudos que avaliam comparativamente o desempenho fotossintético de organismos através da fluorescência da clorofila são bastante comuns e têm fornecido dados muito importantes quando comparados a outras metodologias de avaliação da fotossíntese, tanto para organismos cultivados em laboratório quanto em campo. Ao submeter plantas a pulsos crescentes de luz, pode-se obter informações valiosas sobre o desempenho do aparato fotossintético, resultando em um gráfico chamado curva rápida de luz ou curva FI (fotossíntese x irradiância) (BAKER, 2008; DAU, 1994; MAXWELL; JOHNSON, 2000; NECCHI, 2005).

Diversas metodologias e aparelhos já foram desenvolvidos para se ter acesso às mudanças na intensidade da fluorescência da clorofila *in vivo* e muitos estudos já confirmaram a grande utilidade dos parâmetros derivados dessa metodologia para comparação de desempenho fotossintético de diversos organismos fotossintetizantes, tanto em campo e laboratório quanto em organismos terrestres e aquáticos (BAKER, 2008; JASSBYL; PLATT, 1976; NECCHI, 2005; PLATT; GALLEGOS; HARRISON, 1980).

Pode-se relacionar a assimilação de CO_2 e de NO_3^- proporcionalmente à variação dos parâmetros fotossintéticos derivados das medidas de fotossíntese quando se percebe a inibição simultânea da NR e de enzimas como a frutose-fosfato sintase e a fosfoenolpiruvato carboxilase (que estão intimamente ligadas à fotossíntese) quando se submete a planta ao escuro (MACKINTOSH, 1998). Além disso, as mesmas fosfatases (ex: PP2A1 e PP2A2) catalizam a ativação dessas três enzimas de forma integrada, dependente de ativação pela luz e inibição pelo ácido okadáico (DECHORGNAT et al., 2011; HEIDARI et al., 2011; HELDT; PIECHULLA, 2011). Esse quadro sugere uma regulação integrada desses três processos.

Soma-se a isso a conversão do nitrito a amônia também precisar da fotossíntese devido a nitrito redutase possuir uma demanda grande de potencial redutor fornecido pelas moléculas de NADPH e ferredoxina. Tais moléculas recebem elétrons provenientes da via das pentoses-

fosfato e da excitação do fotossistema I, respectivamente. Todas essas interações metabólicas demonstram a importância do conhecimento dos mecanismos de regulação da assimilação do nitrato para o cultivo de organismos fotossintéticos.

A classificação de organismos fotossintéticos de acordo com seu desempenho na produtividade primária tem sido alvo de muitos estudos já que é fácil de ser estimada através da fluorescência da clorofila. Plantas, fitoplâncton e macroalgas têm sido estudadas, permitindo uma avaliação da contribuição de muitos ecossistemas para a produtividade primária global (ANEMAET; BEKKER; HELLINGWERF, 2010; BAKER, 2008; BEER; AXELSSON, 2004; BLANKENSHIP, 2010; CAI et al., 2010; HAN, 2000; HELBLING et al., 2004; KOOTEN; SNEL, 1990; KROOM, 1994; LIU et al., 2008; MASOJÍDEK et al., 2001; MAXWELL; JOHNSON, 2000; NECCHI, 2005; PAPAGEORGIOU; GOVINDJEE, 2011; PLATT; GALLEGOS; HARRISON, 1980; SILVA et al., 1998; TALARICO; MARANZANA, 2000; TYYSTJIRVI et al., 1999; WHITE; CRITCHLEY, 1999).

1.4 MACROALGAS

As algas pertencem a diferentes filos que englobam desde procariontes clorofilados (Cyanobacteria) até alguns grupos de protistas unicelulares (Dinoflagellata, Cryptomonados, Haptophyta, Glaucophyta, Chlorarachniophyta e o Euglenida) e outros grupos que englobam microalgas eucariontes e macroalgas que são eucariontes multicelulares (Rhodophyta, Chlorophyta, Stramenopiles e Charophyceae). Esses organismos são muito importantes para o para todos os ecossistemas e há muito tempo vem sendo cultivados e estudados, o que demonstra a dependência do ser humano com essa grande diversidade de organismos (BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998; GRAHAM, J. E. et al., 2009; HACKETT et al., 2007; PARFREY et al., 2006).

O gênero *Gracilaria* pertence ao Filo Rhodophyta e Família Gracilariaceae. Possui 168 espécies aceitas taxonomicamente e distribuídas amplamente nos mares tropicais e

temperados em todo o mundo. Destas, 25 espécies já foram registradas no Brasil e 12 são endêmicas: *G. abyssalis*, *G. birdiae*, *G. brasiliensis*, *G. cearensis*, *G. chondroides*, *G. divergens*, *G. flabelliformis*, *G. galetensis*, *G. hayi*, *G. salzmännii*, *G. smithsoniensis* e *G. yoneshigueana* (GUIRY e GUIRY, 2012).

As macroalgas são a principal fonte de ágar-ágar do mundo e de diversos outros produtos para a indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética, saúde pública, energia e agronegócio. Além disso, o seu uso para a biorremediação de águas poluídas por metais e derivados de petróleo vem se destacando como uma alternativa muito importante. (ARESTA et al., 2005; CARDOZO et al., 2007; GRESSLER et al., 2010; GUARATINI et al., 2012; MARINHO-SORIANO et al., 2009; SASIDHARAN et al., 2009). Em relação à biorremediação as macroalgas mostram um enorme potencial por estarem em ambientes geralmente muito sensíveis e frequentemente afetados por contaminações extensas e severas de metais e derivados de petróleo, além de possuírem mecanismos de degradação e/ou acúmulo desses poluentes em seus tecidos, retirando-os do ambiente (PINTO et al., 2003).

Gracilaria birdiae (Figura 4) é uma espécie recentemente descrita apenas para o litoral tropical brasileiro, ocorrendo desde o Ceará até o Espírito Santo. É amplamente coletada para a extração de ágar-ágar, porém seu cultivo ainda se encontra em fase experimental. Possui ciclo de vida do tipo *Polysiphonia* que se completa em cerca de 600 dias em laboratório (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002).

Estudos sobre a fisiologia desta macroalga endêmica podem levar ao aprimoramento do seu cultivo, possibilitando a diminuição da sua exploração predatória, preservando assim os bancos naturais. Além disso, levará a um aumento na eficiência da produção de ficocolóides e outros produtos algáceos, contribuindo significativamente para a economia e para inclusão social de comunidades locais.

Estudos moleculares, como expressão gênica, no metabolismo do nitrogênio em macroalgas ainda são escassos, quando comparado aos estudos com microalgas e plantas terrestres. Entretanto, no Brasil, tem-se tido um aumento significativo neste tipo de estudo, passando pela classificação de espécies por barcoding, caracterização de genes específicos e seus mecanismos regulatórios e estudos de transcriptoma em cultivo e meio natural expostas a diversos poluentes (CASSANO et al., 2012; COSTA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2012; FALCÃO; OLIVEIRA; COLEPICOLO, 2010; NYVALL COLLÉN et al., 2011).

As características da NR variam muito entre os grupos de algas, o que sugere uma diversidade que pode revelar relações evolucionárias e padrões diferentes de adaptação (BERGES, 1997). O conhecimento detalhado da regulação da NR efetivamente contribuirá para a preservação dos ecossistemas costeiros e para o desenvolvimento da economia, devido ao maior entendimento dos fatores limitantes ao crescimento e produtividade algal.

Poucos dados são encontrados na literatura a respeito da caracterização do desempenho fotossintético de macroalgas brasileiras (AYRES, 2009; MARTINS et al., 2011; NECCHI JR.; ZUCCHI, 2001; NECCHI, 2005) e especialmente a espécie *G. birdiae* permanece pouco investigada, apesar de seu potencial econômico e científico. O fato de essa espécie estar sujeita a grandes variações de maré e consequentemente muito exposta a dessecação e altos níveis de radiação UV (MARINHO-SORIANO et al., 2009; PLASTINO; OLIVEIRA, 2002) torna estudos básicos de fotossíntese fundamentais para o melhor conhecimento deste organismo.

Figura 4. Talos de gametófitos da linhagem coletada no Rio Grande do Norte de *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira em cultivo em laboratório.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer um protocolo para ensaio da NR em larga escala e verificar o comportamento de oscilação diária da fotossíntese em *Gracilaria birdiae*.

2.2 Específicos

- a) Aclimação desta linhagem ao cultivo em laboratório;
- b) Caracterização as condições para obtenção da atividade máxima da NR em redução máxima de tempo e biomassa utilizada;
- c) Avaliação de parâmetros fotossintéticos de *G. birdiae* visando à elucidação de sua oscilação diária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e cultivo

Gametófitos de *Gracilaria birdiae* Plastino e E.C. Oliveira foram obtidos do infralitoral no município Rio do Fogo (5° 16' 23.88"S, 35° 22' 47.28"O), Rio Grande do Norte em Dezembro de 2010 coletados pelo grupo da professora Eliane Marinho-Soriano da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.

Para a manutenção dos cultivos e de todos os experimentos utilizou-se água do mar obtida no município de São Sebastião – SP que foi esterilizada por filtração em papel filtro de 3 µm e aquecimento a 100°C durante 1 hora. Em seguida esta foi enriquecida com a solução de von Stosch que contém fosfato, nitrato, metais e vitaminas (composição detalhada na Tabela 1).

As culturas unialgáceas e os experimentos foram realizados em câmaras de cultivo nas seguintes condições: a 500 mg.L⁻¹ biomassa fresca/meio, temperatura média de 25 ± 1°C, sob regime de claro:escuro de 12:12 horas, salinidade 35, pH 8, densidade de fluxo fotônico de 50 ± 5 µE.m⁻².s⁻¹ gerado por 2 lâmpadas tubulares de 1,5 m 40W fluorescentes dispostas verticalmente na frente dos cultivos atrás de uma placa de acrílico que funcionava como difusora da luz. A densidade de fluxo fotônico foi monitorada periodicamente com um medidor de quanta (LI-COR LI-185) com um sensor esférico submersível (Li-Cor LI-193). Todos os experimentos para a determinação da atividade enzimática foram feitos 24 horas após a renovação do meio de cultura, garantindo que os níveis de nutrientes, especialmente nitrato, não fossem limitantes para a síntese da NR.

Tabela 1. Composição química final do meio de cultura enriquecido com a solução de von Stosch (EDWARDS, 1970; YOKOYA, 1996)

Componente	Concentração
NaNO ₃	0,50 mMol.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	30 µMol.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	1µMol.L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 µMol.L ⁻¹
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	10 µMol.L ⁻¹
Tiamina.HCl (B ₁)	0,59 µMol.L ⁻¹
Biotina (B ₈)	4,10 nMol.L ⁻¹
Cianocobalamina (B ₁₂)	1,0 nMol.L ⁻¹

O estabelecimento do cultivo foi obtido a partir do cálculo da taxa de crescimento diário da alga em meio von Stosch. Pesou-se semanalmente triplicatas cada uma contendo seis segmentos de dois centímetros de gametófitos masculinos frescos que eram coletados com pinças estéreis, secos em papel e pesados. Em seguida eram retornados aos frascos de cultivo de 1 litro com 600 mL de meio de cultura novo. Os valores brutos de biomassa de alga fresca foram obtidos a cada 3 dias durante 5 semanas e usados na seguinte equação:

$$R = [\ln(Pf) - \ln(Pi)]t^{-1},$$

onde Pf é o peso final, Pi é o peso inicial e t é o número de dias. A taxa de crescimento relativo diário (TRCD) foi definida como $R \times 100$ (KAIN, 1987).

3.2 Ensaio enzimático da NR

O protocolo seguido consistiu inicialmente na trituração de 100 mg de biomassa fresca congelada em almofariz e pistilo com nitrogênio líquido. O pó obtido foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato a $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 8,0, contendo 5 mMol.L^{-1} EDTA e DTT a 1 mMol.L^{-1} . Após homogeneização vigorosa em vortex, submeteu-se a suspensão a centrifugação a 12.000 RPM por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e mantido a 4°C (LOPES et al., 2002).

Um ensaio *in vitro* descontínuo, onde a reação é interrompida após intervalos fixos de tempo e o produto é detectado em uma segunda reação específica (ROGERS; GIBON, 2009), foi feito a partir da adição de nitrato e de NADH e de sulfato de magnésio a $0,5 \text{ mMol.L}^{-1}$ ao sobrenadante. Utilizou-se como controle negativo (branco) para cada amostra uma alíquota do extrato bruto imediatamente após a adição de NADH, caracterizando o tempo inicial. Antes da adição de NADH foi feita uma pré-incubação de 15 minutos. A solução de NADH foi feita no momento da reação solubilizando-o em tampão Tris.HCl 50mM pH 7.

A reação foi interrompida adicionando-se ZnSO_4 a $1,4 \text{ mMol.L}^{-1}$ e etanol 43% v/v, em concentrações finais. A solução resultante foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 RPM para precipitação de proteínas. Para detecção da concentração de nitrito adicionou-se sulfanilamida (10% HCl) e 5 minutos depois n-(1-naftil) etilenodiamina diidrocloreto (NED) em concentrações finais de $9,6 \text{ mMol.L}^{-1}$ e $0,7 \text{ mMol.L}^{-1}$, respectivamente (CHOW et al., 2004). Estes compostos juntos são chamados de reagente de Griess (GRIESS, 1879), que complexam com o nitrito e produzem um composto diazo detectável por espectrofotometria pela absorção a 543 nm (Fig. 5).

A absorbância detectada foi convertida em nMol.mL^{-1} baseado em uma curva padrão de nitrito (Figura 6-A). Para obtenção da atividade específica da NR, dada em $\text{nMol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, fez-se a razão da concentração de nitrito pelo tempo e pela concentração de proteínas

totais em mg.mL^{-1} obtida por uma curva padrão de proteínas totais (Figura 6 – B) feita pela detecção de albumina sérica bovina (BSA) através do método *coomasie blue* (BRADFORD, 1976).

Figura 5. Reações envolvidas na detecção de nitrito. A Sulfanilamida em meio ácido se complexa ao nitrito. Na presença de N-1 Naftil-Etilenodiamina diidrocloreto (NED), forma-se um composto diazo que confere a cor rosa à reação, extraído de (modificado de SUN et al., 2003).

Foram estudadas as condições experimentais para se obter a atividade enzimática máxima de NR foram nas seguintes variáveis:

- a) Velocidade de produção de NO_2^- ao longo do tempo ($V_0 \times t$);

A partir do extrato bruto e mesmas concentrações das soluções necessárias para o ensaio como descrito no item 3.2 e concentrações saturantes de nitrato e NADH, foi verificada a linearidade na detecção de nitrito entre 5 e 80 minutos.

b) Atividade enzimática ao longo de gradiente de temperatura;

Após o estabelecimento de um tempo ideal para detecção de nitrito e onde a velocidade da reação é constante, submeteu-se as mesmas condições anteriores a uma variação de temperatura de 5 a 50°C. Triplicatas para as 10 temperaturas testadas foram feitas em tubos contendo 50µL de extrato bruto filtrado enriquecido com MgSO₄ e nitrato. Os tubos foram colocados em termociclador com gradiente de temperatura que foi programado para permanecer em cada temperatura no tempo estabelecido pela curva anterior (item “a”). O programa foi iniciado a partir da adição de NADH.

c) Atividade enzimática ao longo de gradiente de pH;

Estimou-se a atividade enzimática ao longo de um gradiente de pH dos extratos brutos em tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ com pH corrigido para 5 a 10 com NaOH e HCl.

d) Determinação do K_M aparente de NO₃⁻

Após detecção de ótima de temperatura e de pH para NR, variou-se a concentrações final de nitrato, por diluição seriada, a partir de uma solução de 10 mMol. L⁻¹ a 9,7 µMol.L⁻¹

e) Determinação do K_M aparente de NADH.

Fez-se uma diluição seriada em tampão Tris.HCl de uma concentração inicial de NADH de 800 µMol.L⁻¹ até 1,56 µMol.L⁻¹ e adicionou-se volumes iguais aos tubos de reação.

f) Determinação da especificidade pelo cofator

Para testar a afinidade da NR por NADPH utilizou-se a mesma concentração ótima verificada para NADH e aplicou-se em um ensaio nas condições determinadas anteriormente.

Em todos os ensaios acima se utilizou uma amostra em tempo zero de reação, ou seja, imediatamente após a adição de NADH a reação foi parada.

Para todos os ensaios retirou-se as os sais e moléculas pequenas endógenas através de filtração por colunas comerciais de matriz superfina de sephadex G-25 de 5 mL com uma massa molecular relativa de corte de 5000 Da, garantindo a separação da NR de impurezas que podem interferir na reação.

A partir dessas curvas, determinou-se as condições ótimas para o ensaio da NR e calculou-se K_M aparente para NO_3^- e NADH através da regressão não linear de Hill.

Este novo protocolo foi desenvolvido por nós para otimização metodológica e redução de tempo e de biomassa e adaptação para análise de múltiplas amostras simultaneamente, visando futuramente experimentos em larga escala, como os de ritmicidade biológica da atividade enzimática.

3.3 Fotossíntese

As propriedades fotossintéticas de *G. birdiae* foram estimadas pela análise da fluorescência da clorofila. Esta análise foi feita usando um fluorômetro portátil de pulso de amplitude modulada PAM-2500 (Walz, Effeltrich, Germany) conectado a um PC com o programa WinControl e, para cada amostra, dois parâmetros principais foram determinados:

1. O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (RQE), $\Delta F/F'm$, onde $\Delta F = F_m' - F_t$; $F'm$ é a fluorescência máxima de uma planta iluminada, e F_t é a fluorescência transitória; 2. A taxa de transporte de elétrons relativa (rETR), calculada como $\Delta F/F_m' \times \text{PAR}$, onde PAR é a irradiância em $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;

Foram realizadas curvas rápidas de luz (Curvas FI) com base nos valores de rETR obtidos em níveis crescentes de irradiância (até $503 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Esta curva permite o rápido acesso a 4 parâmetros principais calculados através de uma equação de ajuste proposta por

PLATT; GALLEGOS; HARRISON (1980). Através do registro da rETR sob um aumento constante de intensidade da iluminação é possível calcular a eficiência fotossintética (parâmetro alfa), a fotossíntese máxima (máximo rETR), a irradiância de saturação (I_k) e quantificar a fotoinibição (parâmetro beta). Os cálculos foram feitos com o programa OriginPro 8,0 onde a equação de fotossíntese máxima foi inserida (PLATT; GALLEGOS; HARRISON, 1980).

3.3 Planejamento experimental

Para avaliar a ritmicidade dos parâmetros fotossintéticos, planejou-se a realização de duas séries simultâneas de experimentos. Na primeira, os cultivos de macroalgas foram mantidos em regime de claro/escuro 12:12 horas e na segunda série foram mantidos em claro constante.

Todos os experimentos foram feitos por 72 horas com coletas a cada 3 horas em triplicatas biológicas com biomassa correspondente a cerca de 15 mg que eram armazenadas em microtubos e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. Os fracos do experimentos de claro constante passaram por 48 horas de aclimação à nova condição de cultura.

3.4 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator considerando-se um limite de confiança de 95%, seguido do teste de correção de Student-Newman-Keuls para o estabelecimento do cultivo e da caracterização enzimática. Para a análise circadiana, inicialmente, fez-se ANOVA seguido do teste de correção de Bonferroni. Encontrada uma variação significativa, para determinar os períodos das oscilações, utilizou-se a transformada rápida de Fourier (Fast Fourier Transform). Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa OriginLab (versão 8.0).

A transformada de Fourier decompõe uma função oscilatória em ondas de seno e cosseno e quantifica suas contribuições para o padrão rítmico dos dados. Ela é bastante utilizada em diversas áreas para processamento de sinais e em cronobiologia. Com esta função é possível converter uma série de dados ao longo do tempo (que não demonstram informações claras sobre de sua frequência) em uma série de frequências, onde suas magnitudes estão diretamente relacionadas com sua ritmicidade (CAMARGO, 2012; ENRIGHT, 1984a; MONNIER et al., 2010; PLAUTZ et al., 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do cultivo unialgal

A aclimação de macroalgas ao cultivo em laboratório é uma atividade bastante laboriosa e tem como pré-requisito a obtenção de um cultivo unialgal, característica que demanda muito tempo. Em campo, as populações de macroalgas geralmente são usadas por muitos organismos, como diatomáceas e cianobactérias, como refúgio e para obtenção de nutrientes (GRAHAM; WILCOX; GRAHAM, 2009). Em laboratório tais organismos podem se proliferar mais rápido que a macroalga de interesse, culminando em completa contaminação do cultivo. Existem muitos protocolos fornecem métodos para o isolamento de macroalgas para cultivo em laboratório, mas ainda assim, esta é uma atividade longa e que consome muito tempo do pesquisador (CHOI et al., 2002; COELHO et al., 2012; FERNANDES et al., 2011; FRIES, 1963; SHEA; CHOPIN, 2006).

As dificuldades de cultivo aumentam quando o organismo que parasita a alga é outra macroalga endofítica. Este tipo de infecção é uma das mais graves, já que o hospedeiro pode sofrer necroses, rompimento da parede celular, diminuir seu crescimento e ficar mais suscetível a infecções secundárias por bactérias, fungos e/ou diatomáceas (APT, 1984; CORREA; MCLACHLAN, 1994). Além disso, não existem antibióticos específicos para algas vermelhas parasitas o que leva a um aumento no esforço manual para retirá-la através de atrito mecânico e sucessivos repiques do hospedeiro. No caso dessa linhagem de *G. birdiae* uma espécie ainda não identificada de parasita endofítico (Figura 6) permaneceu por sucessivos meses de forma resistente, impedindo que os experimentos pudessem ser prosseguidos.

Figura 6 – Microscopia óptica do parasita de *G. birdiae*. A- Ápice infectado por um “tufo” do parasita. Aumento de 8x. B – Detalhes do parasita em aumento de 1000x.

Os resultados da taxa de crescimento mostraram que após um tratamento de seis meses com diversos métodos de isolamento já descritos (FERNANDES; YOKOYA; YONESHIGUE-VALENTIN, 2011) além de tratamento com coquetéis de antibióticos (CHOI *et al.*, 2002), *G. birdiae* foi bem aclimatada às condições de cultivo e isolada, chegando a uma taxa de crescimento diário máxima (TCRD) de 6,5% (Figura 7).

Figura 7. Curva de crescimento de *G. birdiae* ao longo de 35 dias. O meio foi renovado a cada três dias. TCRD significa taxa de crescimento relativo diário.

A taxa de crescimento relativa ao peso inicial se mostrou decrescente devido ao constante volume de cultura e, conseqüente, disponibilidade de nutrientes, resultando em um decréscimo de 70% da taxa de crescimento em 35 dias. Apesar disso, o ganho de biomassa líquida se manteve constante, já que o meio foi renovado a cada três dias.

G. birdiae se mostrou aclimatada ao cultivo em incubadoras, já que em meio natural sua taxa de crescimento foi de 4,5% de TCRD (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2009), sendo cerca de 30% maior em laboratório. *G. domingensis* submetida à otimização de cultivo através

de análise multivariada apresentou um crescimento máximo de 6,5% tanto em meio natural enriquecido quanto em meio artificial (MENDES et al., 2012). Portanto, pode-se dizer que a alga em estudo mostrou uma taxa de crescimento muito boa quando comparada a estudos similares.

Essa linhagem de *G. birdiae* demonstrou menores taxas de crescimento quando comparada a outros estudos com a mesma espécie (PLASTINO; URSI; FUJII, 2004; URSI; GUIMARÃES; PLASTINO, 2008). Tal fato pode ser explicado por diversos fatores utilizados neste estudo como: menor densidade de fluxo fotônico, ausência de aeração do meio, diferente solução de enriquecimento e/ou origem da água do mar. Entretanto, tais fatos não influenciaram negativamente no resultado final do trabalho, já que a alga manteve constante seu crescimento líquido. Percebe-se também que o tempo de duplicação de sua biomassa foi de 11 dias quando cultivada em 35 mg de biomassa por 100 mL de meio de cultura.

Diversos estudos com crescimento de algas vermelhas têm sido feitos e fornecem taxas de crescimento sob diversas condições que servem como parâmetro de classificação da adaptabilidade das algas ao cultivo em laboratório. *Gracilaria domingensis* mostrou 6,5%, *G. tenuistipitata* 25%, *G. lemaneiformis* 1,5%, *Bangiopsis subsimplex* 0,33%, *G. chorda* 12,3% e *G. cornea* 8% (BARUFI et al., 2010; FERREIRA; BARUFI; PLASTINO, 2006; FIGUEROA et al., 2010; MARTINS, 2007; MENDES et al., 2012; PLASTINO; URSI; FUJII, 2004; URSI; GUIMARÃES; PLASTINO, 2008; YE; WANG; WANG, 2006; YU; YANG, 2008). A partir destas taxas de crescimento percebe-se que *G. birdiae* mostrou um crescimento mediano às condições utilizadas.

4.2 Ensaio Enzimático da NR

A atividade de NR sob diversas condições foi obtida com sucesso. Para o desenvolvimento de estudos de caracterização enzimática comparativa e experimentos em ritmos biológicos a redução e automação de processos são fundamentais, baseado no fato de que diversas amostras devem ser medidas simultaneamente. Visando este princípio, adaptou-se diversos passos do ensaio enzimático inicial (descrito no item 4.2), sem perder sensibilidade e reprodutibilidade. Portanto, o foco do estudo se manteve nas seguintes variáveis:

- a) Biomassa inicial e concentração de extrato bruto;
- b) Volume de detecção final, permitindo análise em microplacas;
- c) Tempo total do protocolo.

Visando principalmente essas três vertentes, a seguintes modificações foram feitas:

1. Redução da biomassa inicial de 100 para 20 mg;
2. Suspensão do pó triturado em 100 μL de tampão para extração em vez de 1 mL;
3. Redução do volume final de detecção de 1 mL para 50 μL ;
4. Parada da reação com a solução de sulfanilamida em vez de $\text{ZnSO}_4/\text{EtOH}$;
5. Exclusão da segunda centrifugação de 10 minutos;

Reduziu-se o volume total da solução de extração, mas se aumentou a concentração final do extrato bruto de 100 mg.mL^{-1} para 200 mg.mL^{-1} . Esta alteração, somada à trituração automática das amostras com esferas de metal de cinco mm em microtubos de 1,5 mL em um moinho de trituração que processa 5 microtubos por minuto (10 amostras em 2 minutos), permitiu a solubilização do pó resultante da trituração em 100 μL , fato que reduziu o tempo de manipulação das amostras e evitou a perda de biomassa que ocorre com almofariz e pistilo de cerâmica durante a transferência da biomassa para os microtubos.

Com uma concentração maior de extrato bruto foi possível reduzir o volume de 1 reação para 50 μL , o que tornou possível a utilização de um volume total de 200 μL para incubação, obtendo por tubo as triplicatas experimentais e o controle negativo.

A precipitação de proteínas em $\text{ZnSO}_4/\text{EtOH}$ foi excluída para diminuir o tempo de análise. Tal passo é essencial para retirar a turbidez e parar a reação enzimática da NR de amostras com alta concentração de proteínas como o sangue humano (MCNALLY; LIU; CHOUDARY, 1997), entretanto para o extrato bruto de *G. birdiae* o ensaio se mostrou reprodutível, mesmo sem essa etapa. Este fato pode ser explicado pela purificação das amostras em colunas feita antes da incubação que diluiu o extrato bruto e tirou diversos possíveis interferentes da reação.

A detecção da atividade enzimática e de proteínas totais se mostrou precisa e reprodutível mesmo em pequenos volumes ao desenvolver as curvas padrão de nitrito e BSA com regressões lineares muito confiáveis (R^2 para NO_2^- = 0,993 e R^2 para BSA = 0,994). Foi possível detectar NO_2^- em concentrações variando de 2,5 nMol.L^{-1} e de BSA de 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7), ambos para volume final de 200 μL (em placa de 96 poços) em vez de e 1 mL (em cubeta) no protocolo inicial.

A exclusão da etapa de precipitação em $\text{ZnSO}_4/\text{EtOH}$ já é conhecida e foi usada por outro estudo que visava à determinação rápida de níveis de nitrato e nitrito em amostras múltiplas de *Candida utilis* (MCNALLY et al., 1997). Esta adaptação se mostrou muito útil já que economiza 10 minutos de centrifugação além do tempo de manuseio e pipetagem dos reagentes.

Figura 7. Curvas padrão. A – Curva padrão de nitrito. Equação: $y = 0,0021 + 0,00628x$ ($R^2 = 0,993$). B – Curva padrão de BSA. Equação: $y = 0,03118 + 1,28897x$ ($R^2 = 0,994$).

Para a caracterização da NR de *G. birdiae*, submeteu-se o extrato bruto à filtração em mini colunas de Sephadex G-25, dessalinizando o extrato, mais rapidamente que a diálise. Como exemplo obteve-se a curva de caracterização da coluna com o extrato bruto enriquecido com nitrito para determinação do tempo de separação como pode ser observado na Figura 8.

A injeção das amostras nas colunas foi feita usando-se uma bomba peristáltica com controle de fluxo que possui um sistema que totaliza um volume de 1,5 mL. O tempo de injeção do extrato bruto na coluna foi de 45 segundos e após isso as coletas para a construção da curva de eluição da coluna foi feita.

Coletou-se amostras de 330 µL de extrato bruto diluído para o ensaio enzimático. Simultaneamente a quantidade de proteína e nitrito para cada amostra foi obtida e a atividade de NR se apresentou intensa logo no início da eluição (em 30 segundos), como mostra a Figura 8. O nitrito adicionado ao extrato somente foi registrado a partir dos 90 segundos após o início da eluição com pico máximo a 110 segundos, demonstrando uma separação rápida e precisa (Figura 8).

Figura 8. Caracterização da mini-coluna sephadex G-25 de 5 ml com extrato bruto misturado com nitrito a 5 mMol.L⁻¹. Percebe-se os picos bem separados. O fluxo utilizado foi de 2 mL.min⁻¹. O NO₂⁻ e as proteínas totais foram detectados de acordo com os métodos descritos no item 3.2.

Observou-se um pequeno aumento de absorção no comprimento de onda de 543 nm sobrepondo no mesmo ponto de atividade enzimática, que pode corresponder a um falso positivo já que a cor do extrato bruto é muito semelhante à cor final gerada pelo reagente de Griess, indicando absorbância no mesmo comprimento de onda.

A filtração do extrato bruto antes de qualquer experimento é muito importante já que elimina todos os possíveis interferentes como sais, metais ou outras moléculas pequenas que podem ser acumuladas dentro e/ou fora das células. Um exemplo dessas possíveis interferências é a presença ubíqua do mecanismo de captação/armazenamento e eliminação de nitrato e nitrito em plantas. (COLLOS, 1998). O excesso de um desses íons pode existir durante o rompimento das células, podendo levar a erros graves, como a superestimação da real constante de afinidade (K_M) da enzima devido ao desconhecimento da concentração exata em que se afere a atividade enzimática. Outro tipo de erro comum é a subestimação da atividade enzimática devido à coloração avermelhada dos brancos sem NADH,

frequentemente utilizados, devido à presença de pigmentos proteicos. Após a filtração esses pigmentos são bastante diluídos, fornecendo um meio mais preciso e reprodutivo de estimar o ensaio da NR em macroalgas.

As curvas de caracterização da cinética enzimática indicam que os parâmetros físico-químicos ideais para obtenção da atividade máxima da NR de *G. birdiae* são:

- a) Incubação de 60 minutos (Figura 9);
- b) $50 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ de NADH (Figura 10);
- c) $1,25 \text{ mMol.L}^{-1}$ de NO_3^- (Figura 11);
- d) Tampão fosfato em pH 8 (Figuras 12);
- e) Temperatura ótima de 25°C (Figuras 13).

Descrevemos a seguir os detalhes da obtenção destes parâmetros. A atividade enzimática exibiu um aumento constante ao longo do tempo. Como pode ser observado na figura 9, a velocidade calculada na faixa linear é de aproximadamente de $0,14 \pm 0,01 \mu\text{Mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Estabeleceu-se 60 minutos como tempo padrão para todas as análises seguintes. Devido à diluição do extrato bruto durante a filtração, as absorbâncias ideais para detecção só foram obtidas neste tempo.

Figura 9. Produção linear de nitrito ao longo do tempo no ensaio da NR. Cada ponto corresponde à média de 3 experimentos independentes. A velocidade se manteve constante em $140 \pm 10 \text{ nMol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ($R^2=0,955$).

Geralmente a incubação em outros ensaios da NR em outros organismos não passa de 20 minutos, entretanto apresentam concentrações mais elevadas de extrato bruto além de volumes maiores o que garante uma maior quantidade de enzima, aumentando a velocidade da reação. Detalhes da comparação deste estudo com outros similares estão na Tabela 2 (DAVISON, 1984; GRANBOM et al., 2004, 2007; HURD et al., 1995a; LARTIGUE; SHERMAN, 2002; LOPES; OLIVEIRA; COLEPICOLO, 2002; YU; YANG, 2008).

O K_M para o NADH foi de $6 \pm 2,16 \text{ μMol.L}^{-1}$ e a atividade máxima da enzima foi de $5,3 \pm 0,7 \text{ nMol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (Figura 10). Em grandes concentrações de NADH houve uma inibição da atividade da NR. Tal inibição também foi relatada em outras algas como *G. chilensis* (CHOW; OLIVEIRA; PEDERSÉN, 2004) e *G. caudata* (CHOW et al., 2007), mas não foi observada em *Porphyra yezoensis* (NAKAMURA; IKAWA, 1993).

O K_M para o nitrato foi de $109 \pm 11 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ (Figura 11) valor bem diferente dos K_M de outras algas como *G. chilensis*: $680 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ (CHOW et al., 2004), e *Porphyra yezoensis*: $23 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ (NAKAMURA; IKAWA, 1993). Diferente de *G. chilensis*, não houve inibição da atividade mesmo em valores extremos de nitrato (CHOW et al., 2004). Por outro lado, o valor encontrado neste trabalho é próximo ao encontrado por LOPES et al. (2002) para *G. tenuistipitata* (Tabela 2).

GRUPO	ESPÉCIE	g/mL tampão fosfato	Volume de extrato bruto (μL)	pH ótimo	K _M NADH (μM)	K _M NO ₃ ⁻ (mM)	Atividade da NR (μUg ⁻¹)	Referencia
Rhodophyta	<i>G. birdiae</i> Plastino & Oliveira	0,2	40	8	6,05	0,109	5,37	Este estudo
	<i>G. tikvahiae</i> Mc Lachlan	s.d	s.d	s.d	s.d	s.d	43,3	(HWANG; WILLIAMS; BRINKHUIS, 1987)
	<i>G. tenuistipitata var liui</i> Zhang & Xia	0,08	100	8,0	95,0	0,197	43	(LOPES; OLIVEIRA; COLEPICOLO, 1997)
	<i>G. tenuifrons</i> (Bird e Oliveira) Fredericq & Hommersand	0,1	100	8,0	12,2	0,031	90	(WANDERLEY, 2009)
	<i>G. chilensis</i> Bird, Mc Lachlan e Oliveira	0,1	50	8,0	8,0	0,680	253,2	(CHOW; OLIVEIRA; PEDERSÉN, 2004)
	<i>G. caudata</i> J. Agardh	0,2	50	8,0	22,0	3,950	92,9	(CHOW <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Kappaphycus alvarezii</i> (Doty) Doty ex P.Silva	0,1	s,d	8,0	5,0	0,03	0,16*	(GRANBOM <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Hypnea musciformes</i>	0,1	100	8	0,2	0,049	40,08	(MARTINS, 2007)
	<i>Porphyra sp</i>	s,d	s.d	s.d	s.d	s.d	4	(HURD et al., 1995b)
	<i>Porphyra perforata</i> J. Agardh	s.d	s.d	8,5	32,0	0,030	s.d	(THOMAS; HARRISON, 1988)
	<i>Porphyra yezoensis</i> J. Agardh	s.d	s.d	8,5	23,0	0,060	s.d	(NAKAMURA; IKAWA, 1993)
Chlorophyta	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	s.d	s.d	s.d	50	0,25	s.d	(THOMAS; HARRISON, 1988)
	<i>Ulva sp</i>	s.d	s.d	s.d	s.d	s.d	9,3	(HURD et al., 1995b)
Stramenopiles	<i>Costaria costata</i> (C.Agardh) De A.Saunders	s.d	s.d	s.d	s.d	s.d	10,7	(HURD et al., 1995b)
	<i>Fucus gardneri</i> P. C. Silva	0,6	3000	7,9	180	0,99	40	(HURD et al., 1995b)

Tabela 2. Caracterização das condições ótimas para o ensaio *in vitro* da NR e as constantes de Michaelis-Menten (K_M) para o NADH e nitrato para diferentes

espécies de algas (s.d= sem dados). * Atividade enzimática específica em Um^g⁻¹ de proteínas totais. Modificado de (CHOW *et al.*, 2007).

Figura 10. Atividade enzimática da NR exposta a concentrações crescentes de NADH. A atividade máxima foi de $5,4 \pm 0,7 \text{ nMol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ e o K_M $6 \pm 2,2 \mu\text{Mol.L}^{-1}$. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes. $R^2 = 0,947$.

A NR é uma enzima que possui um mecanismo do tipo “*ping-pong*” bi-bi que é um tipo de reação multi-substrato, no caso usando o NADH e o nitrato como substratos (CAMPBELL; SMARRELLI, 1978; LILLO; RUOFF, 1992). Primeiramente o NADH se liga a seu sítio, que pode sofrer competição por NAD^+ , reduzindo o domínio FAD que transfere os elétrons através do citocromo b até o domínio que contem a molibdopterina, onde o nitrato se liga e sofre redução a nitrito (CAMPBELL, 1999). A NR de *G. birdiae* mostrou uma menor afinidade ao nitrato que ao NADH o que sugere que pode também obedecer este tipo de mecanismo já descrito para plantas terrestres. Estudos mais detalhados com avaliação da inibição por NAD^+ e nitrito são necessários para a elucidação completa deste mecanismo para rodófitas.

Figura 11. Atividade enzimática da NR submetida a concentrações crescentes de NO₃⁻. A atividade máxima foi de $2,32 \pm 0,07$ nMol.min⁻¹.mg⁻¹ e o K_M foi de 109 ± 11 μMol.L⁻¹. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes. $R^2 = 0,98$.

O pH ótimo para a atividade enzimática demonstrou a mesma tendência dos trabalhos anteriormente publicados, sendo em 8 o seu máximo de atividade (Figura 12). Tal informação sugere que a estrutura do sitio ativo da enzima deve possuir um arranjo de aminoácidos que em pH 8 possuem pKas ótimos para a catálise. Como mostrado na figura 12, pequenas variações de pH, acima ou abaixo de 8, induzem a um decréscimo significativo da atividade específica da NR

A temperatura ótima para o ensaio ficou dentro de um intervalo de 15°C a 25°C (Figura 13), sendo o máximo a 25°C confirmando o esperado já que esta alga é de regiões tropicais. Entretanto, com um aumento de 5°C a atividade cai à zero, demonstrando a grande sensibilidade da enzima ao aumento de temperatura a partir de 25°C.

Outras algas apresentaram uma resiliência menor a esta variação de temperatura (CHOW; OLIVEIRA; PEDERSÉN, 2004; GRANBOM et al., 2004; HURD et al., 1995a; MARTINS; CHOW; YOKOYA, 2009; NAKAMURA; IKAWA, 1993). Geralmente a atividade máxima se dá na média de temperatura do ambiente onde a alga foi coletada. Entretanto, *G. birdiae* mostrou um atividade enzimática com variação de apenas 15% em um intervalo de 10°C o que era inesperado e demonstra uma aclimação maior desta espécie a variações de temperatura que não ocorrem em seu meio natural. Este pouca variação na atividade em um intervalo grande de variação de temperatura pode estar relacionado também à compensação de temperatura registrada em processos regulados por ritmos circadianos. Entretanto, experimentos em claro constante em diversas temperaturas devem ser feitos para verificar se o período é mantido similar ao período em ciclo claro/escuro.

Figura 12. Atividade enzimática da NR sobre diferentes pH do tampão de extração. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes.

Figura 13. Atividade enzimática da NR sobre diferentes temperaturas de incubação do ensaio. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes.

Ao final da otimização testou-se a sensibilidade do protocolo adaptado frente ao protocolo inicial (Figura 14). O novo protocolo mostrou uma atividade 48x maior sob as mesmas condições de ensaio. Além subestimar a atividade, o protocolo inicial ainda desperdiça 70% do extrato bruto que poderia ser utilizado para outras análises (de 1 mL apenas 0,3 mL são utilizados para fazer réplicas experimentais).

Paralelamente a esta comparação, analisou-se a sensibilidade da NR ao NADPH como cofator. Realizou-se um ensaio na mesma concentração onde a atividade é máxima para NADH e obteve-se uma atividade praticamente desprezível (Figura 14). Este resultado corrobora com a literatura mostrando que a NR é específica apenas para NADH em macroalgas vermelhas (CHOW; OLIVEIRA; PEDERSÉN, 2004; GRANBOM et al., 2004; MARTINS; CHOW; YOKOYA, 2009).

Figura 14. Ensaio comparativo da NR. Em A foi utilizado o protocolo proposto por este estudo em $50 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ de NADH e $1,25 \text{ mMol.L}^{-1}$ de NO_3^- . B – Resultado do ensaio da atividade enzimática em $40 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ de NADH e 6 mMol.L^{-1} de NO_3^- . C – Ensaio da NR em $50 \mu\text{Mol.L}^{-1}$ de NADPH e $1,25 \text{ mMol.L}^{-1}$ de NO_3^- .

O protocolo otimizado para ensaio da NR consiste dos seguintes passos para uma reação sem réplicas:

1. Pesar e secar em papel 20 mg de biomassa e colocar em microtubos de 1,5 mL. Congelar em nitrogênio líquido imediatamente. Armazenar em -80°C por tempo indeterminado;
2. No momento da análise retirar até 24 amostras do freezer e colocar 2 esferas de 5 mm dentro dos microtubos e manter em nitrogênio líquido;
3. Distribuir os tubos nas caçapas do triturador e colocar a frequência em 30 Hertz durante 1 minuto;

4. Preparar a solução de extração em tampão fosfato $0,2 \text{ Mol.L}^{-1}$ pH 8 com 1 mMol.L^{-1} de EDTA, 1 mMol.L^{-1} de DTT e 1x de coquetel de inibidores de protease;
5. Dispensar $100 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de extração em cada tubo. Vortexar até descongelar, gerando o extrato bruto (EB);
6. Retirar as esferas de metal com um ímã;
7. Centrifugar por 15 minutos em 12.000 RPM a 4°C ;
8. Preparar a solução de reação com $3 \text{ }\mu\text{L}$ de KNO_3 $0,1 \text{ Mol.L}^{-1}$ e $2 \text{ }\mu\text{L}$ de MgSO_4 $12,5 \text{ mMol.L}^{-1}$;
9. Injetar $100 \text{ }\mu\text{L}$ do EB em uma coluna sephadex G25 a 2 mL.min^{-1} ;
10. Coletar o EB filtrado (EB_f) durante 10 segundos após 1:15 min;
11. Lavar a coluna com tampão fosfato por 3 minutos a 2 mL.min^{-1} ;
12. Retirar $40 \text{ }\mu\text{L}$ do EB_f e misturar com a solução de reação;
13. Pré incubar por 15 minutos em termociclador a 25°C ;
14. Preparar a solução de NADH em tampão Tris.HCl 1 M pH 8;
15. Pipetar $5 \text{ }\mu\text{L}$ de NADH $0,5 \text{ mMol.L}^{-1}$ em cada tubo de reação;
16. Incubar por 60 minutos;
17. Utilizar como branco uma amostra com NADH, mas não incubada;
18. Pipetar $100 \text{ }\mu\text{L}$ de Sulfanilamida 20 mMol.L^{-1} nos poços da placa de leitura;
19. Adicionar $50 \text{ }\mu\text{L}$ da reação aos poços com sulfanilamida para parar a reação;
20. Adicionar $50 \text{ }\mu\text{L}$ de NED 3 mMol.L^{-1} ;
21. Incubar por 5 minutos;
22. Verificar absorbância em espectrofotometria em 543 nm .

Este protocolo com volume reduzido permite a análise de 24 amostras biológicas simultaneamente em microplacas em cerca de 3 horas, todas com triplicata experimental e

biológica e com controle negativo. Além de simplificar o método e permitir múltiplas análises este protocolo se adequou para uma redução máxima de biomassa, de reagentes e, consequentemente, de resíduos. No protocolo antigo cerca de 500 µL de reagentes sobravam para cada tubo utilizado, porém neste protocolo proposto este resíduo caiu para 5 µL.

Estudos mais recentes em ritmos circadianos têm demonstrado que a redução e automatização facilitam a análise e fornecem dados mais robustos em organismos como *O. tauri*, *C. reinhardtii*, *A. thaliana* e *S. elongatus* (JOHNSON et al., 2011; O'NEILL e REDDY, 2011; TROEIN et al., 2011). Não somente em organismos fotossintetizantes, mas para qualquer modelo tal conceito é essencial, um exemplo são as análises do comportamento de camundongos em rodas de exercício que registram ao longo de meses a frequência da atividade dos animais submetidos a diversas condições. (CASIRAGHI et al., 2012; VALENTINUZZI et al., 2009), utilizando o menor esforço possível do observador.

Dada a importância da via de assimilação de nitrato, este experimento robusto em larga escala da NR permite que uma comparação do potencial biotecnológico entre espécies de macroalgas seja feita rapidamente. Visando o melhor desempenho na assimilação de nitrato, pode-se escolher a melhor espécie tanto para experimentos em laboratório quanto para cultivo em larga escala em meio natural.

4.3 Fotossíntese

A fotossíntese de *G. birdiae* foi caracterizada a partir dos resultados obtidos das curvas rápidas de luz (Figura 15 – A), onde se observou que a taxa de transporte de elétrons foi mais intensa próximo à terceira hora de luz. A partir dessas curvas, calculou-se que: a rETR máxima foi de 15,29 $\mu\text{Mol de elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a eficiência fotossintética foi de 0,37 elétrons/fótons, a irradiância de saturação (I_K) foi de 41,32 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e houve fotoinibição a partir de 300 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Estes valores máximos permitem classificar *G. birdiae* como uma alga adaptada à sombra (NECCHI, 2005), esta classificação é feita quando se encontram valores altos de eficiência fotossintética, baixa irradiância de saturação e a presença de fotoinibição. Poucos trabalhos que classificam algas de acordo com esses parâmetros já foram publicados (NECCHI JR.; ZUCCHI, 2001; NECCHI, 2005)

Em claro constante as curvas de luz não mostraram diferença entre os horários de claro subjetivo e de escuro subjetivo (Figura 15 – B). Isso implica na ausência de regulação de ritmos circadianos sobre estes fatores. Entretanto, tais curvas podem dificultar a análise da oscilação individual dos parâmetros, que será descrita a seguir.

Figura 15. Curvas FI, demonstrando a variação da taxa de transporte de elétrons ao longo do aumento da intensidade luminosa ao longo do dia para *G. birdiae*. A – Curvas de luz de algas submetidas a ciclo claro/escuro 12:12, mostrando uma diferença significativa entre a rETR no claro e escuro ($p=0,002$). B – Curvas de luz de algas submetidas ao claro constante, evidenciando que não há diferença entre as rETRs em escuro subjetivo e claro. A partir de $300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ percebe-se a queda na curva relativa à fotoinibição. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes.

A oscilação do RQE mostrou um perfil significativo de oscilação em ciclo de claro/escuro (F valor = 10,83, $p < 0,001$), com amplitude média de $0,512 \pm 0,04$. O máximo rendimento foi sempre na terceira hora de claro (Figura 16 – A), que diminuiu cerca de 24% até a sexta hora de escuro. Já em claro constante a oscilação de RQE exibiu um perfil completamente dessincronizado, com diferenças não significativas (F valor = 1,1; $p = 0,37$) ao longo das 72 horas, entretanto demonstraram amplitude média similar ao claro/escuro: $0,49 \pm 0,02$ (Figura 16 – B). Além disso, a análise da periodicidade mostra que não houve uma sustentação do período da oscilação (Figura 17).

O rendimento quântico efetivo é diretamente proporcional à porcentagem de luz emitida pela fluorescência da clorofila comparada à luz incidida. É uma medida indireta e que permite uma avaliação geral do desempenho fotossintético (BAKER, 2008; BEER; AXELSSON, 2004; SAKSHAUG et al., 1997). Até o momento não foram encontrados estudos detalhados em algas sobre a oscilação de parâmetros fotossintéticos derivados da fluorescência da clorofila. Entretanto, sabe-se que em plantas o melhor desempenho da fotossíntese ocorre durante as primeiras horas de luz (BELSHE; DURAKO; BLUM, 2007; RASCHER et al., 2001), estes resultados sugerem um comportamento similar para algas.

Em relação à taxa de transporte de elétrons, o perfil de oscilação em ciclo claro/ escuro exibiu uma oscilação significativa (F valor= 31,01; $p < 0,001$) com uma média dos valores de $7,9 \mu\text{M e}^{-} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 18 – A), mas em claro constante houve uma oscilação significativa (F valor = 4,43; $p < 0,001$) com média de $8,46 \mu\text{M e}^{-} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 18 – B). Apesar da significância estatística, esta oscilação não demonstrou nenhum padrão rítmico, ou seja, não exibiu um período irregular pela transformada de Fourier (Figura 19).

Figura 16. Oscilação diária do rendimento quântico efetivo (RQE). A – Oscilação do RQE das algas expostas a ciclo claro:escuro 12:12 ao longo de 72 horas. B – Oscilação do RQE das algas expostas à claro constante, as barras hachuradas indicam o período de escuro subjetivo. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes.

Figura 17. Transformada de Fourier para o rendimento quântico efetivo. A - em ciclo claro/escuro apresenta fotoperíodo de 24 horas. B – Em claro constante, múltiplos picos não permitem a determinação precisa do comprimento do fotoperíodo.

Figura 18. Oscilação diária da taxa de transporte de elétrons relativa (rETR). A – Oscilação da rETR das algas expostas a ciclo claro:escuro 12:12 ao longo de 72 horas. B – Oscilação da rETR das algas expostas a claro constante, as barras hachuradas indicam o período de escuro subjetivo. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes.

Figura 19. Transformada de Fourier para a taxa de transporte relativa de elétrons. A - em ciclo claro/escuro apresenta fotoperíodo de 24 horas. B - Em claro constante perde completamente a ritmicidade, mostrando diversos picos para o comprimento do fotoperíodo.

Em relação ao parâmetro alfa, o perfil de oscilação foi significativo em ciclo claro/escuro (F valor= 2,46; $p = 0,013$) com uma média dos valores de $0,18 \mu\text{M e}^{-} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 20 - A) e em claro constante também exibiu oscilação significativa (F valor = 7,79; $p < 0,001$) com média de 0,204 (Figura 20 - B).

O experimento circadiano mostrou que apenas o parâmetro alfa manteve sua ritmicidade independente da luz (Figura 21 A - B), o que pode significar uma interação com o mecanismo endógeno de regulação dos ritmos circadianos. Outro fato interessante foi a intensidade dos fatores que se manteve na média mesmo em claro constante, contrariando o esperado que era a diminuição brusca devido ao grande *input* de elétrons que poderia causar um stress oxidativo na membrana do cloroplasto. Este fotodano pode ser detectado mais claramente pela realização um novo experimento onde se aplique uma irradiância máxima maior do a que foi usada nas curvas rápidas de luz ($503 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) .

A oscilação circadiana do parâmetro alfa parece ser ainda influenciada pelo tempo em que a alga foi mantida em ciclo de claro/escuro. Tal fato pode ser comprovado pelo fato do final da curva em claro constante já demonstrar uma tendência de oscilar com menores amplitudes (Figura 20 - B). A aclimatação da alga à luz constante pode ter levado a uma queda na produção de pigmentos devido à fotoxidação, justificando a diminuição da oscilação de alfa. Este fato sugere que a absorção de elétrons é, em parte, dependente dos ritmos circadianos via pigmentos. Mais experimentos são necessários para comprovar tal hipótese, sendo a quantificação de clorofila e ficobiliproteínas experimentos essenciais para a elucidação deste mecanismo.

Figura 20. Oscilação diária do parâmetro alfa. A – Oscilação de alfa das algas expostas a ciclo claro:escuro 12:12 ao longo de 72 horas, as barras escuras indicam claro. B – Oscilação de alfa das algas expostas a claro constante, as barras hachuradas indicam o período de escuro subjetivo. Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes.

Figura 21. Transformada de Fourier para o parâmetro alfa. A - em ciclo claro/escuro apresenta fotoperíodo de 24 horas. B – Em claro constante mantém o comprimento do fotoperíodo.

O parâmetro alfa e o RQE representam o rendimento quântico da fotossíntese, mas diferem entre si pelo fato do primeiro ser definido em termos de luz incidida (I_i), ou seja, elétrons gerados por fóton incidido, e o segundo de luz absorvida (I_a), elétrons gerados por fótons absorvidos (SAKSHAUG et al., 1997; WALZ, 1998). Dessa forma, o parâmetro alfa é uma medida indireta da capacidade de conversão quanta em elétrons.

Essas duas formas de calcular o rendimento quântico diferem devido ao fato das plantas aquáticas e macroalgas possuírem um fator de absorbância menor que 1 (BEER; AXELSSON, 2004; SILVA et al., 1998) o que resulta em uma absorção incompleta da energia incidida. Este fato faz com que, frequentemente, alfa e RQE se diferenciem bastante.

Neste estudo este fato é visível e influenciou inclusive na análise circadiana desses parâmetros. Ao calcular o comprimento do fotoperíodo através da transformada de Fourier (figura 21) fica evidente que mesmo em claro constante o parâmetro alfa mostrou um ritmo circadiano robusto, ao manter um fotoperíodo de 24 horas. Fato que não pode ser percebido na mesma análise para o RQE e para rETR (Figuras 17 e 19, respectivamente).

Este ritmo pode estar associado à oscilação circadiana de proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons do FSII. Uma delas é a proteína D1 (BOOIJ-JAMES et al., 2002). O fotossistema II é um complexo de proteínas e pigmentos que possui um centro de reação composto pelas clorofilas especiais ligadas às proteínas D1 e D2. Além da regulação de sua atividade pelo balanço redox e pela luz (BOOIJ-JAMES et al., 2002; HELDT; PIECHULLA, 2011), a proteína D1 demonstra ritmo com período de 24 horas onde há um ciclo de fosforilação de uma treonina N-terminal. Não está claro ainda se esta fosforilação atua na regulação da dimerização do centro de reação ou se pode direcionar a D1 à degradação (RINTAMAKI; KETTUNEN; et al., 1995; RINTAMAKI; SALO; et al., 1995; SANTINI et al., 1994). Esta oscilação da regulação da proteína D1 pode influenciar diretamente na conversão dos fótons em elétrons e consequentemente no rendimento da

fotossíntese demonstrado pelo parâmetro alfa. Uma análise da oscilação de pigmentos também poderia corroborar para a elucidação da causa desta oscilação do parâmetro alfa, já que estes influenciam diretamente na capacidade de conversão de fótons em elétrons.

A luz pode ser o principal fator de regulação da ritmicidade da expressão da NR, já que a partir da fotossíntese o efeito circadiano é transmitido a partir da produção de açúcares que receberão o agrupamento amino na síntese de glutamina. Fato já comprovado em experimentos com tabaco e *Arabidopsis* que na ausência de luz e presença de glicose, o ritmo da transcrição da NR permanece igual (CHENG et al., 1992; KLEIN et al., 2000; VINCENTZ et al., 1993).

Informações preciosas poderiam ter sido obtidas caso fosse possível a avaliação da extinção não fotoquímica da fluorescência (*non-photochemical quenching* – NPQ). Este parâmetro pode fornecer informações sobre a transformação da energia luminosa absorvida em calor através da excitação dos pigmentos fotossintéticos. Tal característica pode ter ligação direta com adaptação da alga ao estresse luminoso, ou seja, pode quantificar o quanto os mecanismos de fotoproteção a intensidades elevadas de luz estão ativos. Para ter acesso a esse parâmetro, os ápices da alga deveriam ser aclimatados ao escuro por 30 minutos antes da aferição da fluorescência da clorofila. Entretanto, tal tempo seria suficiente para tornar a amostragem dos ápices inviável, já que poderia criar uma sobreposição entre o tempo das amostragens. Devido a isso, optou-se por não verificar o NPQ e deixa-lo para momentos posteriores.

Muitas questões metodológicas específicas abrangem os experimentos na cronobiologia. Um desenho experimental extensivo é de extrema importância para evitar armadilhas comuns ao avaliar um ritmo biológico. Uma das questões básicas é um grande período de observação da oscilação do ritmo em livre curso. Uma longa amostragem permite a exclusão de interferentes impostos por ciclos ambientais desconhecidos (ENRIGHT, 1984b). Infelizmente

não foi possível a amostragem de biomassa algal por mais de três dias devido ao limite permitido de biomassa por volume de meio de cultura que foi obtido (Figura 7) para manter a alga sobre grande disponibilidade de nutrientes. Percebeu-se também que ao final do experimento de claro constante muitos ápices já mostravam despigmentação. Este fenômeno pode estar intimamente ligado à fotoxidação de pigmentos e de moléculas transportadoras de elétrons da fotossíntese devido à geração de radicais livres (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001).

Experimentos ao longo de mais dias podem esclarecer melhor a adaptação de *G. birdiae* à luz constante e evidenciar de forma mais robusta quais são os parâmetros que podem estar sendo realmente regulados pelos mecanismos do relógio circadiano central. Todavia, estes experimentos precisam ser feitos em cultivo com PFDs menores e num intervalo de tempo maior para permitir a avaliação de diferentes fatores da fotossíntese e evitar que a alga entre em um quadro de estresse luminoso.

5. CONCLUSÕES

Uma nova linhagem de *Gracilaria birdiae* proveniente do Rio Grande do Norte está aclimatada ao cultivo em laboratório e foi isolada a nível unialgal com sucesso.

O novo protocolo permite a amostragem de cinco vezes menos biomassa para a análise em larga escala da cinética enzimática. Além disso, permite a análise simultânea de 24 testes em 3 horas, com mínima produção de resíduos e 48x mais sensibilidade que o protocolo inicial.

A NR de *G. birdiae* não possui atividade com NADPH, ou seja, é específica para NADH. Além disso, possui maior afinidade pelo NADH ($K_M 6 \pm 2,2 \mu\text{Mol.L}^{-1}$) que pelo nitrato ($K_M 109 \pm 11 \mu\text{Mol.L}^{-1}$) e apresenta atividade máxima em pH 8 e em ampla faixa de temperatura (15- 25°C).

Os parâmetros fotossintéticos de *G. birdiae* são máximos na terceira hora de luz. Além disso, o RQE e rETR oscilam ao longo do ciclo claro/escuro e em claro constante mantém valores médios constantes, mas perdem a periodicidade. O parâmetro alfa pode estar sincronizado à regulação circadiana de proteínas e pigmentos do fotossistema II.

6. APÊNDICES

6.1 EXPRESSÃO GÊNICA DA NR

6.1.1. Extração de ácidos nucleicos

A extração do RNA de *Gracilaria birdiae* foi feita de acordo com o protocolo descrito pelo manual do kit de extração de RNA de plantas *PureLink™ Plant RNA reagent* (Invitrogen) que permite a purificação de RNA total de tecidos vegetais, especialmente aqueles ricos em polifenóis e amido.

Inicialmente, 700mg de alga foram pesados e tratados com 5 ml do reagente de extração, logo depois vortexados e incubados por 5 minutos. Após a centrifugação a 2600 x g, o sobrenadante foi tratado com NaCl a 5 mol.L⁻¹ e clorofórmio para separação de fases e o álcool isopropílico para precipitação. Após a extração as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro para verificar a pureza e concentração de RNA, sendo confirmadas em seguida por eletroforese em gel de agarose a 1,2%.

Para viabilizar o experimento circadiano, tal protocolo também foi submetido a testes para redução de biomassa utilizada, visando experimentos de ritmicidade biológica.

6.1.2. PCR quantitativa

Um micrograma do RNA extraído de *G. birdiae* foram submetidos a tratamento com DNase seguindo protocolo Turbo DNA-Free (Ambion). A PCR reversa foi feita com o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* utilizando *primers* randomicos. A síntese do cDNA iniciou-se com a desnaturação do RNA a 65°C por 5 minutos, adicionou-se 10 µL do mix de síntese e fez-se um ciclo de 10 minutos a 25°C para anelamento do *primers*, 50°C por 50 minutos para síntese e 5 minutos a 85°C para inativação da transcrição reversa.

Para quantificação da expressão gênica a PCR quantitativa (qPCR) foi realizada a partir da adição de 5 ng do cDNA a 5µL dos iniciadores relativos à NR e EF-1α em

concentrações de 400 a 1000 nMol.L⁻¹ e 10 µL do mix do reagente SYBR Green (Applied Biosystems). A mistura foi submetida a 1 ciclo de 2min a 50°C e 10min a 95°C para ativação da polimerase, seguido de 40 ciclos de termociclagem, constituídos por 95°C por 30s e 60°C por 1 min. As reações foram realizadas no termociclador de PCR em tempo real *StepOne* (Applied Biosystems) e foram analisadas pelo programa *Sequence Detection*, versão 1.2, Applied Biosystems.

Os *primers* que foram utilizados para o gene da NR possuem a seguinte sequência: F:5'- CGCCAAGAACCACCAATGTA-3' e R:5'- CGTCCGGGCTGT TTTTGT- 3' com temperatura de anelamento de 56°C e geram um fragmento de 56pb. Como controles endógenos, testou-se *primers* para os genes: EF-1α e GAPDH. Todos os *primers* foram desenhados a partir das sequencias disponibilizadas da alga *Gracilaria tenuistipitata*. As sequencias foram: para EF-1α, F: 5' – AAGGATCTCGCCGTGAAGAG – 3' e R: 5' – TTCGGCGTCCCATCATG – 3' com temperatura de anelamento de 56°C e gerando um fragmento de 52pb e para GAPDH, F: 5' – GCGGCGCGAAGAAGGT – 3' e R: 5' – CAAACATGGGCGCATCCT – 3' com temperatura de anelamento de 57°C gerando um produto de PCR de 54pb.

6.2 RESULTADOS

A extração do DNA e o RNA de *G. birdiae* mostraram bandas em eletroforese em agarose 1,2% (Figura 22 – A e 13 – B) assim como a PCR do cDNA dos genes constitutivos Actina e EF-1α (Figura 21 - C).

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1,2% do DNA genômico de *G. birdiae* evidenciado em A, RNA total (B) e da PCR do DNA dos gene Actina (Act) e EF-1 α (C), onde o marcador de 1kb.

Os experimentos para otimização da PCR quantitativa de NR ainda estão sendo desenvolvidos. Conseguiu-se extrair cerca de $300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de RNA em 35 mg de ápices, o que diminuiu em 20x demanda de alga necessária para realizar a análise circadiana. Já se coletou todas as amostras necessárias e os experimentos serão iniciados quando for possível a amplificação do gene da nitrato redutase, o que ainda não foi possível. Até o momento o fator limitante para a PCR em tempo real tem sido o passo do tratamento do RNA com DNase para evitar amplificação cruzada com DNA. Tal procedimento tem degradado significativamente o RNA como mostra a figura 22. Neste sentido, com o aprimoramento da metodologia e um RNA de melhor qualidade as amplificações do mRNA da NR certamente serão alcançadas.

Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 1,2%. 1 – DNA genômico de *G. birdiae*. 2 – RNA total. 3 – RNA tratado com DNase mostrando um arrasto que sugere degradação.

Provavelmente a quantidade de RNA conseguido com este protocolo de extração não é suficiente para suprir a degradação de RNA inerente do tratamento pela DNase. O próximo passo será a extração de RNA com esferas magnéticas que pode fornecer uma quantidade maior de RNA a partir de pouca biomassa. Os testes para *primers* de NR não foram bem sucedidos tanto com DNA ou RNA. Entretanto para GAPDH conseguiu-se obter bandas definidas (Figura 23), mostrando a especificidade dos *primers*. Novos *primers* de NR serão construídos para atender a uma amplificação mais eficiente.

Muitas adaptações ainda são necessárias para ter acesso a informação sobre os níveis oscilatórios do mRNA da nitrato redutase em *G. birdiae*. Esta espécie mostra muito potencial para estudos em biologia molecular de ritmos circadianos, mas é necessário um maior investimento de tempo na adaptação, principalmente, de metodologias para extração de RNA para pequenas quantidades de biomassa. Tais experimentos terão continuidade em estudos posteriores.

Figura 24 – Gel de eletroforese em agarose 1,2%. Letra A representa teste de *primers* para NR. Letra B representa teste de *primers* para GAPDH. Letra C e D representa teste de *primers* para EF. Onde há número 1 a reação foi feita de DNA; número 2 de RNA com concentração elevada; número 3 RNA com RNA diluído; número 4 de cDNA; número 5 de controle negativo da reação de cDNA e número 6 de amostra sem DNA, RNA ou *primer*: controle negativo.

REFERÊNCIAS

- ALABADÍ, D. et al. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5531, p. 880-3, 3 ago. 2001.
- ANEMAET, I. G.; BEKKER, M.; HELLINGWERF, K. J. Algal photosynthesis as the primary driver for a sustainable development in energy, feed, and food production. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 12, n. 6, p. 619-29, nov. 2010.
- APT, K. E. EFFECTS OF THE SYMBIOTIC RED ALGA HYPNEOCOLAX STELLARIS ON ITS HOST HYPNEA MUSCIFORMIS (HYPNEACEAE, GIGARTINALES)1. **Journal of Phycology**, v. 20, n. 1, p. 148-150, mar. 1984.
- ARESTA, M. et al. Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, n. 3, p. 136-139, 29 nov. 2005.
- ASCHOFF, J. Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen. **Die Naturwissenschaften**, v. 38, n. 21, p. 506-507, 1951.
- ASCHOFF, J. **Biological Rhythms**. 2. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1984. p. 553
- ATAYA, F. S. et al. Mcp1 encodes the molybdenum cofactor carrier protein in Chlamydomonas reinhardtii and participates in protection, binding, and storage functions of the cofactor. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 13, p. 10885-90, 28 mar. 2003.
- AYRES, L. M. **Efeitos da radiação UV-B em variantes cromáticas de Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, conteúdo pigmentar, fotossíntese e ultra-estrutura**. [S.l.] Universidade de São Paulo, 2009.
- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 89-113, jan. 2008.
- BARUFI, J. B. et al. Life history, morphological variability and growth rates of the life phases of Gracilaria tenuistipitata (Rhodophyta: Gracilariales) in vitro. **Scientia Marina**, v. 74, n. 2, p. 297-303, 16 mar. 2010.
- BEER, S.; AXELSSON, L. Limitations in the use of PAM fluorometry for measuring photosynthetic rates of macroalgae at high irradiances. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 1-7, fev. 2004.
- BELL-PEDERSEN, D. et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nature Reviews: Genetics**, v. 6, n. 7, p. 544-556, 2005.
- BELSHE, E. F.; DURAKO, M. J.; BLUM, J. E. Photosynthetic rapid light curves (RLC) of Thalassia testudinum exhibit diurnal variation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, p. 253-268, 2007.
- BERGES, J. A. Miniview: Algal nitrate reductases. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 01, p. 3-8, 1 fev. 1997.
- BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. **Plant physiology**, v. 116, p. 9-15, 1998.
- BLANKENSHIP, R. E. Early evolution of photosynthesis. **Plant physiology**, v. 154, n. 2, p. 434-8, out. 2010.

- BOOIJ-JAMES, I. S. et al. Phosphorylation of the D1 Photosystem II Reaction Center Protein Is Controlled by an Endogenous Circadian Rhythm. **Plant physiology**, v. 130, n. December, p. 2069-2075, 2002.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 7 maio. 1976.
- CAI, B. et al. Characterization of photosystem II photochemistry in transgenic tobacco plants with lowered Rubisco activase content. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 17, p. 1457-65, 15 nov. 2010.
- CAMARGO, J. M. **Ontogênese do ritmo de consumo de oxigênio em operárias de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera:Meliponini): a influencia da luz.** [S.l.] Universidade de São Paulo, 2012.
- CAMPBELL, W. H. NITRATE REDUCTASE STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 50, p. 277-303, jun. 1999.
- CAMPBELL, W. H. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 58, n. 2, p. 194-204, fev. 2001.
- CAMPBELL, W. H.; SMARRELLI, J. Purification and Kinetics of Higher Plant NADH:Nitrate Reductase. **Plant physiology**, v. 61, n. 4, p. 611-6, abr. 1978.
- CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007.
- CARRÉ, I. A.; EDMUNDS, L. N. Oscillator control of cell division in *Euglena*: cyclic AMP oscillations mediate the phasing of the cell division cycle by the circadian clock. **Journal of cell science**, v. 104 (Pt 4, p. 1163-73, abr. 1993.
- CASIRAGHI, L. P. et al. Forced desynchronization of activity rhythms in a model of chronic jet lag in mice. **Journal of biological rhythms**, v. 27, n. 1, p. 59-69, 1 fev. 2012.
- CASSANO, V. et al. Morphological and molecular studies on the Brazilian native red seaweed *Laurencia oliveirana* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 838-849, ago. 2012.
- CHENG, C. L. et al. Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 1861-4, 1 mar. 1992.
- CHOI, J. et al. Procedures for the axenic isolation of conchocelis and monospores from the red seaweed *Porphyra yezoensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 2, p. 115-121, 2002.
- CHOW, F. et al. Characterization of nitrate reductase activity in vitro in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 123-129, mar. 2007.
- CHOW, F.; OLIVEIRA, M. C. DE; PEDERSÉN, M. In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 7, p. 769-776, jul. 2004.
- COELHO, S. M. et al. How to cultivate *Ectocarpus*. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2012, n. 2, p. 258-61, 1 fev. 2012.

- COLLOS, Y. Nitrate uptake, nitrite release and uptake, and new production estimates. **Marine Ecology Progress Series**, v. 171, p. 293-301, 1998.
- CORREA, J. A.; MCLACHLAN, J. L. Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). V. Fine structure of the infection by *Acrochaete operculata* (Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 29, n. 1, p. 33-47, fev. 1994.
- COSTA, E. S. et al. The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of São Paulo, Brazil—a DNA barcoding approach. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1643-1653, 6 maio. 2012.
- CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant cell**, v. 7, n. 7, p. 859-68, jul. 1995.
- DAU, H. Short-term adaptation of plants to changing light intensities and its relation to Photosystem II photochemistry and fluorescence emission. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 26, p. 3-27, 1994.
- DAVISON, I. R. Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. II. The role of nitrate availability in the regulation of enzyme activity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 79, p. 65-78, 1984.
- DE OLIVEIRA, L. S. et al. Transcriptomic analysis of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta) and its microbiome. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 487, 17 set. 2012.
- DECHORGNAT, J. et al. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1349-59, fev. 2011.
- DENG, M. D. et al. Effect of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 29, p. 239-247, 1991.
- DRIESSCHE, V. T.; BONOTTO, S. The circadian rhythm in RNA synthesis in *Acetabularia mediterranea*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 179, n. 1, p. 58-66, mar. 1969.
- DUNLAP, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks. **Cell**, v. 96, p. 271-290, 1999.
- DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; DECOURSEY, P. J. **Chronobiology: Biological Timekeeping**. I ed. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., 2004. p. 382
- EDWARDS, P. **Illustrated guide to the seaweeds and seagrasses in the vicinity of Port Arkansas, Texas**. Austin, Texas, EUA: [s.n.]. p. 228
- ENRIGHT, J. T. Data Analysis. In: KING, F. A. (Ed.). **Biological Rhythms**. 2. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1984a. p. 21-39.
- ENRIGHT, J. T. Methodology. In: KING, F. A. (Ed.). **Biological Rhythms**. 2. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1984b. p. 11-20.
- FALCÃO, V. R.; OLIVEIRA, M. C. DE; COLEPICOLA, P. Molecular characterization of nitrate reductase gene and its expression in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, 2010.
- FERNANDES, D. R. P.; YOKOYA, N. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Protocol for seaweed decontamination to isolate unialgal cultures. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 313-316, abr. 2011.
- FERNANDEZ, E.; GALVAN, A. Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 4, p. 555-9, abr. 2008.

- FERREIRA, L. B.; BARUFI, J. B.; PLASTINO, E. M. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 1, p. 187-192, mar. 2006.
- FIGUEROA, F. L. et al. Effect of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation to short-term stress (UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). **Marine pollution bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1768-78, out. 2010.
- FISCHER, K. et al. Structural Basis of Eukaryotic Nitrate Reduction : Crystal Structures of the Nitrate Reductase Active Site. **The Plant cell**, v. 17, n. April, p. 1167-1179, 2005.
- FRIES, L. On the cultivation of axenic red algae. **Physiologia plantarum**, v. 16, p. 695-709, 1963.
- GARDNER, M. J. et al. How plants tell the time. **The Biochemical journal**, v. 397, n. 1, p. 15-24, 1 jul. 2006.
- GOTO, K.; LAVAL-MARTIN, D. L.; EDMUNDS, L. N. Biochemical modeling of an autonomously oscillatory circadian clock in *Euglena*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 228, n. 4705, p. 1284-8, 14 jun. 1985.
- GRAHAM, J. E.; WILCOX, L. W.; GRAHAM, L. E. **Algae**. 2nd. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2009. p. 720
- GRANBOM, M. et al. Characterisation of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). **Aquatic Botany**, v. 78, n. 4, p. 295-305, abr. 2004.
- GRANBOM, M. et al. Nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta): oscillation due to the protein level. **Botanica Marina**, v. 50, n. 2, p. 106-112, 1 jan. 2007.
- GREEN, R. M.; TOBIN, E. M. The role of CCA1 and LHY in the plant circadian clock. **Developmental cell**, v. 2, n. 5, p. 516-8, maio. 2002.
- GRESSLER, V. et al. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 585-590, maio. 2010.
- GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". **Ber Deutsch Chem Ges**, v. 12, n. 1, p. 426-428, 1879.
- GUARATINI, T. et al. Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 4, p. 724-729, 2012.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em: 15 out. 2012.
- HACKETT, J. D. et al. Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 8, p. 1702-13, ago. 2007.
- HAN, B.-P. Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. **Journal of Plankton Research**, v. 22, n. 5, p. 865-885, 1 maio. 2000.
- HARMER, S. L. The Circadian System in Higher Plants. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 357-377, 28 abr. 2009.
- HEIDARI, B. et al. Protein phosphatase 2A B55 and A regulatory subunits interact with nitrate reductase and are essential for nitrate reductase activation. **Plant physiology**, v. 156, n. 1, p. 165-72, maio. 2011.

- HELBLING, E. W. et al. Dynamics of potentially protective compounds in Rhodophyta species from Patagonia (Argentina) exposed to solar radiation. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 75, n. 1-2, p. 63-71, 19 jul. 2004.
- HELDT, H.-W.; PIECHULLA, B. **Plant Biochemistry**. 4. ed. Londres, Reino Unido: Elsevier, 2011. p. 618
- HHMI. **Time matters: Biological Clockworks**. Disponível em: <http://www.hhmi.org/biointeractive/museum/exhibit00/02_1.html>. Acesso em: 3 out. 2012.
- HOFF, T.I.; STUMMANN, B. M.; HENNINGSEN, K. W. Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. **Physiologia plantarum**, v. 84, p. 616-624, 1992.
- HOLM, K. et al. Does the core circadian clock in the moss *Physcomitrella patens* (Bryophyta) comprise a single loop? **BMC plant biology**, v. 10, p. 109, jan. 2010.
- HOWARTH, R. W.; MARINO, R.; LANE, J. Nitrogen Fixation in Freshwater , Estuarine , and Marine Ecosystems . 1 . Rates and Importance. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 4, p. 669-687, 1988.
- HURD, C. L. et al. An in vitro nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus Gardneri* (Phaeophyta). **Journal of Phycology**, v. 31, p. 835-834, 1995a.
- HURD, C. L. et al. AN IN VITRO NITRATE REDUCTASE ASSAY FOR MARINE MACROALGAE: OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYME FOR *FUCUS GARDNERI* (PHAEOPHYTA)1. **Journal of Phycology**, v. 31, n. 5, p. 835-843, out. 1995b.
- HWANG, S.-P. L.; WILLIAMS, S. L.; BRINKHUIS, B. H. Changes in Internal Dissolved Nitrogen Pools as Related to Nitrate Uptake and Assimilation in *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Rhodophyta)). **Botanica Marina**, v. 30, n. 1, p. 11-19, 1987.
- JASSBYL, A. D.; PLATT, T. Mathematical formulation of the relationship photosynthesis and light for phytoplankton. **Limnology and Ocenography**, v. 21, n. 4, 1976.
- JOHNSON, C. H.; STEWART, P. L.; EGLI, M. The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. **Annual review of biophysics**, v. 40, p. 143-67, jan. 2011.
- KAIN, J. M. Seasonal growth and photoinhibition in *Plocamium cartilagineum* (Rhodophyta) off the Isle of Man. **Phycologia**, v. 26, n. 1, p. 88-99, 1 mar. 1987.
- KLEIN, D. et al. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden. **Plant, Cell and Enviroment**, v. 23, n. 8, p. 863-871, 2000.
- KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 147-150, set. 1990.
- KROOM, B. M. Variability of photosystem II quantum yield and related processes in *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyta) acclimated to an oscillating light regime simulating a mixed photic zone. **Journal of Phycology**, v. 30, n. 8, p. 841-852, 1994.
- KROUK, G. et al. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 3, p. 266-73, jun. 2010.
- LARTIGUE, J.; SHERMAN, T. FIELD ASSAYS FOR MEASURING NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN ENTEROMORPHA SP (CHLOROPHYCEAE), ULVA SP (CHLOROPHYCEAE) AND GELIDIUM SP (RHODOPHYCEAE). **Journal of Phycology**, v. 982, n. 3, p. 971-982, 2002.

- LATYSHEVA, N. et al. The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Bioinformatics**, v. 28, n. 5, p. 603-606, 2012.
- LILLO, C. et al. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 401, p. 1275-82, jun. 2004.
- LILLO, C.; MEYER, C.; RUOFF, P. The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. **Plant physiology**, v. 125, n. 4, p. 1554-7, abr. 2001.
- LILLO, C.; RUOFF, P. Hysteretic behavior of nitrate reductase. Evidence of an allosteric binding site for reduced pyridine nucleotides. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13456-9, 5 jul. 1992.
- LIU, X. et al. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 2, p. 239-246, 6 set. 2008.
- LOPES, P. F.; OLIVEIRA, M. C. DE; COLEPICOLO, P. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 231, n. 33, p. 225-231, 1997.
- LOPES, P. F.; OLIVEIRA, M. C. DE; COLEPICOLO, P. Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 295, n. 1, p. 50-4, 5 jul. 2002.
- MACKINTOSH, C. Regulation of plant nitrate assimilation: from ecophysiology to brain proteins. **New Phytologist**, v. 139, n. 1, p. 153-159, maio. 1998.
- MARINHO-SORIANO, E. et al. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 2, p. 327-331, fev. 2009.
- MARQUES, M. D. et al. Ritmos da Vida. **Ciencia Hoje**, v. 10, n. 58, p. 42-49, 1989.
- MARQUES, M. D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação temporal. In: **Cronobiologia: Principios e aplicações**. [S.l: s.n.]. p. 45-84.
- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: Principios e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Edusp, 1997. p. 328
- MARTINS, A. P. **Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu .) J . V . Lamour**. [S.l.] Instituto de Botânica, 2007.
- MARTINS, A. P. et al. Effects of nitrate and phosphate availabilities on growth, photosynthesis and pigment and protein contents in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 340-348, abr. 2011.
- MARTINS, A. P.; CHOW, F.; YOKOYA, N. S. Ensaio in vitro da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 4, p. 635-645, dez. 2009.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 286
- MASOJÍDEK, J. et al. Photosystem II electron transport rates and oxygen production in natural waterblooms of freshwater cyanobacteria during a diel cycle. **Journal of Plankton Research**, v. 23, n. 1, p. 57-66, 2001.

- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-68, abr. 2000.
- MCNALLY, N.; LIU, X. Y.; CHOUDARY, P. V. A high-throughput assay format for determination of nitrate reductase and nitrite reductase enzyme activities. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 29-36, jan. 1997.
- MENDEL, R. R. Cell biology of molybdenum in plants. **Plant cell reports**, v. 30, n. 10, p. 1787-97, out. 2011.
- MENDES, L. F. et al. Influence of temperature, light and nutrients on the growth rates of the macroalga *Gracilaria domingensis* in synthetic seawater using experimental design. **Journal of Applied Phycology**, 8 fev. 2012.
- MILLER, A. J. et al. Nitrate transport and signalling. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 9, p. 2297-306, jan. 2007.
- MONNIER, A. et al. Orchestrated transcription of biological processes in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* exposed to light/dark cycles. **BMC genomics**, v. 11, p. 192, jan. 2010.
- MORSE, D. et al. Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 1, p. 172-6, jan. 1989.
- MÜLLER, P.; LI, X.; NIYOGI, K. K. Update on Photosynthesis Non-Photochemical Quenching . A Response to Excess Light Energy. **Plant physiology**, v. 125, p. 1558-1566, 2001.
- NAKAJIMA, M. et al. Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 414-5, 15 abr. 2005.
- NAKAMURA, Y.; IKAWA, T. Purification and Properties of NADH:Nitrate Reductase from the Red Alga *Porphyra yezoensis*. **Plant Cell Physiol.**, v. 34, n. 8, p. 1239-1249, 1 dez. 1993.
- NECCHI JR., O.; ZUCCHI, M. R. Photosynthetic performance of freshwater Rhodophyta in response to temperature, irradiance, pH and diurnal rhythm. **Phycological Research**, v. 49, p. 305-318, 2001.
- NECCHI, O. Light-related photosynthetic characteristics of freshwater rhodophytes. **Aquatic Botany**, v. 82, n. 3, p. 193-209, jul. 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. [S.l.] W. H. Freeman, 2008. v. 4th edition. 1158
- NUSSAUME, L. et al. Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. **The Plant cell**, v. 7, n. 5, p. 611-21, maio. 1995.
- NYVALL COLLÉN, P. et al. Analysis of expressed sequence tags from the agarophyte *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 641-647, 4 maio. 2011.
- ORSEL, M. et al. Nitrate transport in plants: which gene and which control? **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 370, p. 825-33, abr. 2002.
- O'NEILL, J. S. et al. Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 554-558, 2011.
- O'NEILL, J. S.; REDDY, A. B. Circadian clocks in human red blood cells. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 498-503, 27 jan. 2011.

- PAPAGEORGIOU, G. C.; GOVINDJEE. Photosystem II fluorescence: slow changes--scaling from the past. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 104, n. 1-2, p. 258-70, 2011.
- PARFREY, L. W. et al. Evaluating support for the current classification of eukaryotic diversity. **PLoS genetics**, v. 2, n. 12, p. e220, dez. 2006.
- PINTO, E. et al. HEAVY METAL-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN ALGAE. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 6, p. 1008-1018, dez. 2003.
- PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. DE. Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v. 41, n. 4, p. 389-396, 11 jul. 2002.
- PLASTINO, E. M.; URSI, S.; FUJII, M. T. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 52, n. 1, p. 45-52, mar. 2004.
- PLATT, T.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v. 38, p. 687-701, 1980.
- PLAUTZ, J. D. et al. Quantitative analysis of Drosophila period gene transcription in living animals. **Journal of biological rhythms**, v. 12, n. 3, p. 204-17, jun. 1997.
- RASCHER, U. et al. Spatiotemporal variation of metabolism in a plant circadian rhythm : The biological clock as an assembly of coupled individual oscillators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11801-11805, 2001.
- RINTAMAKI, E.; SALO, R. et al. Regulation of D1-protein degradation during photoinhibition of photosystem II in vivo : Phosphorylation of the D1 protein in various plant groups. **Planta**, v. 195, n. 3, p. 379-386, 1995.
- RINTAMAKI, E.; KETTUNEN, R. et al. Light-dependent phosphorylation of D1 reaction centre protein of photosystem II: hypothesis for the functional role in vivo. **Physiologia Plantarum**, v. 93, n. 1, p. 191-195, jan. 1995.
- ROENNEBERG, T.; MORSE, D. Two circadian oscillators in one cell. **Nature**, v. 362, n. 6418, p. 362-364, 25 mar. 1993.
- ROGERS, A.; GIBON, Y. Enzyme Kinetics: Theory and practice. In: JÖRG SCHWENDER (Ed.). **Plant Metabolic Networks**. 1st. ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2009. p. 71-103.
- SAKSHAUG, E. et al. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 11, p. 1637-1670, 1997.
- SANTINI, C. et al. Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization in vivo. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 221, n. 1, p. 307-15, 1 abr. 1994.
- SASIDHARAN, S.; DARAH, I.; NOORDIN, M. K. M. J. Screening antimicrobial activity of various extracts of Gracilaria changii. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 1, p. 72-76, jan. 2009.
- SCHEIBLE, W.-R. et al. Tobacco mutants with a decreased number of functional nia genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription , post-translational modification and turnover of nitrate reductase. **Planta**, v. 203, n. 3, p. 304-319, 22 out. 1997.

- SHEA, R.; CHOPIN, T. Effects of germanium dioxide, an inhibitor of diatom growth, on the microscopic laboratory cultivation stage of the kelp, *Laminaria saccharina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 1, p. 27-32, 29 nov. 2006.
- SILVA, J. et al. Light response curves for *Gelidium sesquipedale* from different depths, determined by two methods: O₂ evolution and chlorophyll fluorescence. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 3, p. 295-301, 1998.
- SOLOMONSON, L. P.; BARBER, M. ASSIMILATORY NITRATE REDUCTASE: FUNCTIONAL PROPERTIES AND REGULATION. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 41, p. 225-253, 1990a.
- SOLOMONSON, L. P.; BARBER, M. J. ASSIMILATORY NITRATE REDUCTASE: FUNCTIONAL PROPERTIES AND REGULATION. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 41, p. 225-253, 1990b.
- SUN, J. et al. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276-284, 22 ago. 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3. ed. [S.l.] Sinauer Associates, Inc., 2006. p. 720
- TALARICO, L.; MARANZANA, G. Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 56, n. 1, p. 1-11, jun. 2000.
- THOMAS, T. E.; HARRISON, P. J. A Comparison of In Vitro and In Vivo Nitrate Reductase Assays in Three Intertidal Seaweeds. **Botanica Marina**, v. 31, p. 101-107, 1988.
- TROEIN, C. et al. Multiple light inputs to a simple clock circuit allow complex biological rhythms. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 66, n. 2, p. 375-85, abr. 2011.
- TYRRELL, T. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. **Nature**, v. 400, n. 5, p. 525-531, 1999.
- TYYSTJIRVI, E. et al. Artificial quenchers of chlorophyll fluorescence do not protect against photoinhibition. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 48, p. 142-147, 1999.
- URSI, S.; GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M. Deleterious effect of TRIS buffer on growth rates and pigment content of *Gracilaria birdiae* Platino & EC Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta). **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 3, p. 891-896, 2008.
- VALENTINUZZI, V. S. et al. Circadian pattern of wheel-running activity of a South American subterranean rodent (*Ctenomys cf knightii*). **Chronobiology international**, v. 26, n. 1, p. 14-27, 7 jan. 2009.
- VAN OOIJEN, G. et al. Genomic transformation of the picoeukaryote *Ostreococcus tauri*. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 65, p. e4074, jan. 2012.
- VELASCO, P. J. et al. Synthesis and degradation of nitrate reductase during the cell cycle of *Chlorella sorokiniana*. **Plant Physiology**, v. 89, n. 1, p. 220-224, 1989.
- VINCENTZ, M. et al. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana glauca* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 3, n. 2, p. 315-24, fev. 1993.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 1616

WALZ, H. G. **UNDERWATER FLUOROMETER Submersible Photosynthesis Yield Analyzer Handbook of Operation.** Disponível em: <http://www.walz.com/downloads/manuals/diving-pam/diving-pam_screen.pdf>.

WANDERLEY, A. Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). 2009.

WEINER, H.; KAISER, W. M. **Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine 543 and its binding to 14-3-3 proteins.** *Journal of experimental botany*, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432934>>

WHITE, A. J.; CRITCHLEY, C. Rapid light curves : A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. **Photosynthesis Research**, v. 59, p. 63-72, 1999.

YE, N.; WANG, H.; WANG, G. Formation and early development of tetraspores of *Gracilaria lemaneiformis* (*Gracilaria*, *Gracilariaceae*) under laboratory conditions. **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 219-226, abr. 2006.

YOKOYA, N. S. **Controle do crescimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodofíceas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis*.** [S.l.] Universidade de São Paulo, 1996.

YU, J.; YANG, Y.-F. Physiological and biochemical response of seaweed *Gracilaria lemaneiformis* to concentration changes of N and P. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 367, n. 2, p. 142-148, dez. 2008.

8. CURRICULUM VITAE

Cícero Alves Lima Júnior

Data de nascimento: 18/12/1986

Nacionalidade: Brasileiro

Estado Civil: Solteiro

Profissão: Biólogo

Email: caljr86@gmail.com/cicero@iq.usp.br

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2010-2012 – Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica) – Depto. De Bioquímica – IQ/USP – Bolsa FAPESP processo nº 2010/04856-9: Caracterização da atividade enzimática e análise da expressão gênica da enzima Nitrato Redutase na macroalga *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) durante o ciclo claro/escuro.

2005-2010 – Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas – Departamento de Biologia – Universidade Federal do Maranhão – Bolsa de iniciação científica (CNPq).

2. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Curso Internacional em Biologia Marinha. Université Pierre et Marie Curie - UPMC. (Carga horária: 80h). **2011.**

V Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular. (Carga horária: 80h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. **2009.**

V Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 88h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. **2008.**

II Curso de Inverno em Genética e Evolução. (Carga horária: 80h). Universidade Federal de São Carlos. 2008

Fisk English Course. (Carga horária: 296h). FUNDAÇÃO RICHARD HUGH FISK. **2006**.

3. PUBLICAÇÕES

ALVES-LIMA, C, COLEPICOLO, P (2013). Circadian oscillation of nitrate reductase transcription and activation and its coordination to photosynthetic performance in *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta). **Em preparação.**

4. RESUMOS

ALVES-LIMA, C, COLEPICOLO, P (2012). Nitrogen assimilation system of red macroalgae: Enzymatic and physiological studies. XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguaçu – PR.

ALVES-LIMA, C; MARTINS, A.P; PEREIRA, D. C.; MARINHO-SORIANO, E. ; YOKOYA, N. S.; COLEPICOLO, P. (2010). Caracterização e variação diária da fotossíntese em espécies de *Gracilaria*, *Hypnea* e *Laurencia* (Rhodophyta). XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, 2010, Paraty - RJ.