

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Modulação do Sistema de Assimilação de**  
**Nitrogênio da Cianobactéria Tóxica de Água Doce**  
*Microcystis aeruginosa.*

**Dissertação de Mestrado**

**ANDERSON DE OLIVEIRA SOUZA**

**Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto**

**São Paulo**

**2006**

**O mundo continua a oferecer prêmios brilhantes para aqueles que têm corações valentes e espadas afiadas.**

Lorde Birkenhead

(Decifrando o genoma, Kevin Davies)

**Dedico esta dissertação a meus pais e irmãos.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Pio Colepicolo pela a orientação e também pelo o conhecimento adquirido neste período. Muito obrigado por acreditar em meu potencial e ter me proporcionado diversas oportunidades como pesquisador.

Agradeço a Profa. Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira pelas cepas de *Microcystis aeruginosa* e pela prestatividade em todos os momentos.

Agradeço a Profa. Ohara Augusto que sempre esteve de portas abertas quando necessitei, juntamente com seus excelentes alunos(as). Muito obrigado Danilo, Fernanda, Edilaine e Renata pela a amizade.

Agradeço aos amigos do laboratório, pela a amizade, companheirismo e principalmente pela a sinceridade neste período. Muito obrigado...Adriana, Ana, Thais, Sara, Vanessa, Ângela, Patrícia, Karina, Moacir, Marcelo, Humberto, Paula, Sidnei, Fabiana, Vânia e Prof. Ernani. Muito obrigado Ed e Sandra pela a amizade e todo o apoio técnico.

Aos amigos do bloco 5 Eduardo, Ricardo e Nelson pelo o incentivo e amizade.

Em especial agradeço a minha família, meu refúgio e fortaleza, que tanto me apóia e incentiva em realizar meus ideais. Muito obrigado meu pai por ser este homem incorruptível e leal aos princípios de Deus; minha mãe por todo o amor, conselhos e apoio dedicados a mim e aos meus irmãos André e Adriano pela paciência e amor. AMO MUITO VOCÊS !!!!

Barbara, meu amor...dádiva de Deus em minha vida, muito obrigado pelo o amor, incentivo e apoio...você é muito especial na minha vida. TE AMO MUITO MEU AMOR !!!

Muito obrigado Dra. Patrícia F. Lopes, ou melhor, Pat Lopes pelo o incentivo de sempre buscar por algo que acreditamos, pela sua límpida e sincera amizade e obviamente pela pessoa que é...simples e especial para todos que a conhece.

Aos amigos de São José do Rio Preto, Matheus, Marcos, Janaína, Natália e Patrícia Postilione pela amizade iniciada na Universidade.

Aos amigos que conheci em São Paulo, Willian, Mário, Christiano e Murilo pela amizade e paciência neste período.

Agradeço as agências financiadoras FAPESP e CNPq pelo o suporte financeiro.

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	8
Resumo .....	9
Abstract .....	11
1. Introdução.....	13
1.1.    A microalga <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	13
1.2.    Metabolismo de nitrogênio.....	24
1.3.    Nitrito Redutase: a enzima propulsora do processo de assimilação de nitrogênio.....	27
1.4.    Geração de radicais de nitrogênio .....	34
1.5.    A utilização de oxifluorfenol como heme-inibidor da enzima Nitrito Redutase no estudo da produção de $\cdot\text{NO}$ via NR.....	38
2. Objetivos .....	41
3. Materiais e Métodos .....	42
3.1 Reagentes .....	42
3.2 Cultivo da alga .....	43
3.3 Curva de crescimento .....	43
3.4 Preparação do extrato bruto .....	44
3.5 Medidas da atividade de NR .....	44
3.6 Temperatura ótima de ensaio .....	46
3.7 pH ótimo de ensaio .....	46
3.8 Determinação de $K_M$ aparente para $\text{NO}_3^-$ .....	47
3.9 Determinação de $K_M$ aparente para NADPH e NADH .....	48
3.10 Inibição da atividade de NR usando cianeto .....	48

3.11 Efeito de oxifluorfenol sobre o desenvolvimento de <i>M. aeruginosa</i> .....	49
3.12 Ação do oxifluorfenol no grupo heme .....	49
3.12.1 Atividade de SOD .....	50
3.12.2 Atividade de CAT .....	50
3.13 Ensaio para quantificação de nitrito e nitroso-compostos .....	50
3.14 Quantificação de nitrito .....	51
3.15 Quantificação de S-nitrosotios .....	52
3.16 Quantificação de outras espécies: nitrosil e nitrosaminas .....	52
4. Resultados .....	53
4.1 Caracterização bioquímica da enzima NR .....	53
4.2 Exposição ao oxifluorfenol .....	63
5. Discussão .....	74
6. Conclusões Principais .....	83
7. Referências Bibliográficas .....	84
8. Curriculum Vitae .....	97

## ABREVIATURAS

BSA: soroalbumina bovina

CAT: Catalase

Cit c: citocromo c

Da: Dalton

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

Fd: ferredoxina

IC: concentração inibitória.

LD: light/dark (claro/escuro)

MC: microcistinas

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)

NED: n-naftil etilenodiamina

•NO: óxido nítrico

NR: Nitrato Redutase

NiR: Nitrito Redutase

NOS: Óxido Nítrico Sintase

OA: ácido ocadáico

PP: proteínas fosfatases

rpm: rotações por minuto

PROTOX: Protoporfirinogênio IX Oxidase

SOD: Superóxido Dismutase

SULFA: sulfanilamida



## RESUMO

No ambiente aquático a maior fonte de nitrogênio encontra-se na forma de nitrato que necessita sofrer uma redução para formação de compostos biologicamente aproveitáveis, tais como aminoácidos, bases nitrogenadas e compostos nitrogenados.

A assimilação de nitrogênio é um processo que ocorre em duas etapas catalisadas seqüencialmente pelas enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR). A NR catalisa a redução do nitrato a nitrito (etapa considerada limitante na assimilação de nitrogênio), sendo este posteriormente reduzido a amônio pela NiR. NR está amplamente distribuída e encontrada em diferentes organismos, incluindo bactérias, fungos, cianobactérias, plantas terrestres e algas.

Neste trabalho estudamos a NR de *Microcystis aeruginosa* que é uma cianobactéria tóxica de água doce encontrada principalmente em reservatórios de água. A toxina microcistina quando liberada por esta microalga está associada com problemas de saúde em humanos e animais.

Foi mostrado que a NR de *M. aeruginosa* pertence a classe das NRs biespecíficas para NADH e NADPH. Apresenta constante de Michaelis-Menten aparente ( $K_M$ ) de 1,5 e 1,6 mM para NADPH e NADH, respectivamente. Ainda,  $K_M$  aparente para nitrato foi estimado em 0,6 mM. As condições ótimas de ensaio encontradas foram em pH 10,0 e temperatura em 40°C.

A exposição da *M. aeruginosa* ao herbicida oxifluorfeno (10 µg/L) promoveu a inibição de NiR, possibilitando a quantificação de  $\bullet$ NO formado via NR, enzima que teve sua atividade 6 vezes maior durante a exposição a este agente.

O estudo da enzima NR é de fundamental importância para a compreensão da regulação da expressão de enzimas assimiladoras de nitrogênio bem como dos mecanismos de nutrição e crescimento desta microalga.

## ABSTRACT

Nitrate is the major source of nitrogen in the aquatic environment, which must be reduced before incorporation into biological compounds, such as amino acids, nitrogen bases and nitrogen compounds.

The nitrogen assimilation process occurs in a two-step reaction catalyzed by 2 enzymes working sequentially, nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR). The NR catalyzes the reduction of nitrate to nitrite (is considered the limiting step in the nitrogen assimilation) being this later reduced to ammonium by NiR. NR is widely distributed and found in different organisms, including bacterium, fungus, cyanobacterium, plants and algae.

In this work we study the NR of *Microcystis aeruginosa*, a toxic microalga, mainly found in water reservoirs. The microcystin toxin released by *M. aeruginosa* is associated with problems of health in humans and animals.

We report that NR of *M. aeruginosa* belongs to a biespecific group of NRs for NADH and NADPH. It presents Michaelis-Menten's constant ( $K_M$ ) as 1.5 and 1.6 mM for NADPH and NADH, respectively. The apparent  $K_M$  for nitrate was estimated as 0.6 mM. The optimum conditions of assay found were at pH 10.0 and temperature of 40°C.

The exposition of *M. aeruginosa* to the herbicide oxyfluorfen (10  $\mu\text{g/L}$ ) promotes the inhibition of NiR, and it makes possible to quantify the  $\bullet\text{NO}$  produced by NR, whose has it activity 6 fold higher during the agent exposition.

In order to understand the regulation of nitrogen assimilation enzymes, as well as, the mechanisms of nutrition and growth of this algae, the study of the NR enzyme is of crucial importance.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 – A microalga *Microcystis aeruginosa*.

Numericamente, a maioria do fitoplâncton encontrado em ambientes aquáticos é composta pelas cianobactérias, um extenso grupo de procariotos fotoautotróficos. A base do aparato fotossintético destes organismos consiste de dois centros reativos fotoquímicos designados fotossistema I (PSI) e II (PSII). PSII oxida a água e transfere os elétrons através do citocromo b6/f para PSI, enquanto que simultaneamente forma-se um gradiente de prótons no espaço intermembranas, o qual é utilizado para gerar adenosina 5'-trifosfato (ATP). PSI opera em série com PSII, gerando intermediários bioquímicos com um potencial redox suficientemente baixo para direcionar a redução enzimática de CO<sub>2</sub>, favorecendo a formação de moléculas orgânicas (Falkowski *et al.*, 2004).

O fato das moléculas de água fornecer virtualmente uma infinita suplementação redutora para carrear a fixação de carbono permitiu que as cianobactérias se distribuíssem na superfície da Terra iluminada pelo Sol. Desta forma os produtos de possíveis oxidações nos ambientes aquáticos teriam favorecido a formação de uma nova atmosfera que teria se iniciado por volta de 2,4 bilhões de anos atrás (Falkowski *et al.*, 2004). A capacidade de realizar a fotossíntese foi transmitida para algas e plantas superiores por um evento endossimbiótico que tornou a cianobactéria simbiote uma organela celular, o cloroplasto. A maquinaria fotossintética de ambos, cianobactérias e cloroplastos,

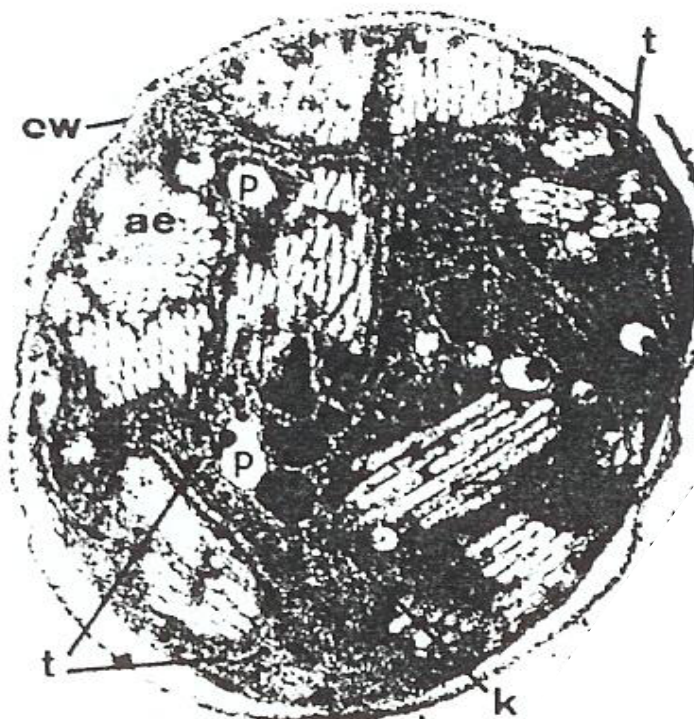
está localizada em um sistema especial de membranas internas, os tilacóides (Vothknecht & Westhoff, 2001).

Cianobactérias têm sido estudadas primariamente por sua morfologia como organismo procarioto, seu mecanismo fotossintético e, certamente, pelos aspectos estruturais (vesículas de gases e sua composição gênica, por exemplo). Tais organismos podem também produzir uma enorme variedade de metabólitos secundários, incluindo compostos que atuam como hormônios, antibióticos, aleloquímicos e toxinas (compostos que possuem um efeito prejudicial sob tecidos, células ou organismos) (Carmichael, 1992).

As toxinas de cianobactérias constituem a maior fonte de biotoxinas ou cianotoxinas produzidas naturalmente, sendo estas encontradas na superfície, principalmente, de água doce. As espécies de cianobactérias encontradas nas comunidades plantônicas que produzem biotoxinas incluem *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* e *Oscillatoria*. Outros gêneros incluindo *Coelosphaerium*, *Cylindrospermopsis*, *Fischerella*, *Gloeotrichia*, *Gomphosphaeria*, *Hapalosiphon*, *Microcoleus*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Spirulina*, *Symploca*, *Tolypothrix* e *Trichodesmium*, têm sido identificados como tóxicos, mas nenhuma cianotoxina foi isolada e caracterizada nestes microrganismos até o momento (Carmichael, 1992). A produção destas cianotoxinas pode estar relacionada a condições de estresse ambiental, tais como, luminosidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes (White *et al.*, 2003).

O gênero *Microcystis* (Cyanophyceae) compreende um dos mais importantes cianoprocariontes do ecossistema de água doce e seu morfotipo é variável (Komárek *et al.*, 2002). São encontrados em numerosos reservatórios de água neutro-alcalinas (pH 6-9), em ambientes de temperaturas temperadas e tropicais com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (Flynn, 2001; Bormans *et al.*, 2005; Wutipraditkul *et al.*, 2005). Embora a morfologia seja simples a taxonomia é dificultada devido a diversidade fenotípica e problemas de cultivo *in vitro*, sendo classificadas como tóxicas e não tóxicas (Komárek *et al.*, 2002).

O organismo modelo, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) (Figura 1), foi gentilmente cedido pela Professora Doutora Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira (ESALQ - USP). A cianobactéria foi isolada em dezembro de 1996 na lagoa das Garças, em um corpo d'água ornamental localizado no PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga).



**Figura 1 – Microscopia óptica da cianobactéria *Microcystis sp.*** O diâmetro entre as espécies desta microalga varia entre 3-6  $\mu\text{m}$ , tendo aumento deste diâmetro de acordo as condições metabólicas, como divisão celular. (cw – parede celular; ae – aerotopes; t – membrana tilacóide; k – carboxissomos; p – grânulos de polifosfato) (Komárek *et al.*, 2002).



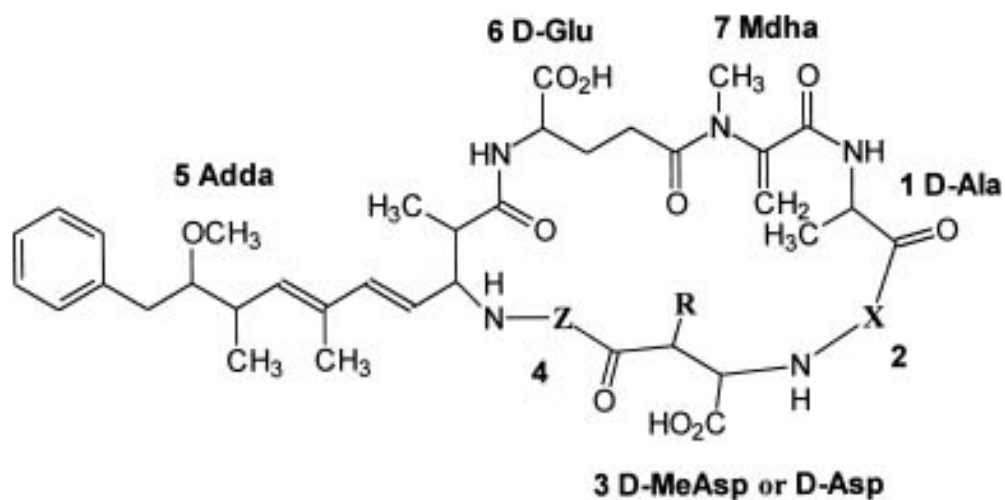
A ação antropogênica facilita a elevação populacional de *M. aeruginosa* (Sellner *et al.*, 2003). Um dos eventos ocorrentes nos ecossistemas aquáticos, comumente associado à liberação de compostos polifosfatados e nitrogenados, é a floração de cianobactérias (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003), sendo composta principalmente por *M. aeruginosa* (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001a). Florações são crescimentos populacionais massivos e descontrolados destes, ou de qualquer outro organismo, em ecossistemas aquáticos ocasionados por alterações ambientais (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003), tais como: elevação da temperatura, luminosidade, disponibilidade de nutrientes (principalmente nitrogênio e fosfato), pH e salinidade em ambientes marinhos (White *et al.*, 2003).

As florações podem causar gosto e odor desagradáveis na água, além de alterar o equilíbrio ecológico do ecossistema aquático. O maior problema, entretanto, está no fato de produzirem biotoxinas (microcistinas, MC) extremamente potentes que atingem um conjunto de organismos muito além daqueles presentes nas comunidades aquáticas (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003).

Estudos evidenciam que a liberação de MC por esta microalga está associada a problemas de saúde para humanos e animais (Codd, 2000; Cardozo *et al.*, 2006). Acredita-se que as MC sirvam como proteção para a alga contra predadores (Jang *et al.*, 2003) por tratar-se de um metabólito secundário (Carmichael, 1992). As MC são liberadas para o ambiente quando as células se rompem e não são eliminadas da água pelos tratamentos convencionais das redes públicas de abastecimento (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001b). A filtração e

floculação da água durante o tratamento são efetivos apenas na remoção de células produtoras de toxinas. Entretanto, há a possibilidade de lise celular neste processo que ocasionaria um aumento na concentração de MC na água tratada. Os processos de tratamento da água com a utilização de ozônio (atuando como agente oxidante) têm-se demonstrado eficientes na remoção das MC se houver o emprego subsequente de sistema de filtração usando carvão ativado, que desempenha potencial de biofilme adsorvendo as MC (Hoeger *et al.*, 2005). Estes processos elevam o preço do tratamento de água que, eventualmente, será transferido ao consumidor final.

As cianotoxinas produzem efeitos especiais nos mamíferos, sendo classificadas como neuro e hepatotóxicas (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001b). As neurotoxinas são potentes agonistas pós-sinápticos colinérgicos causando uma despolarização neuromuscular, bloqueando a passagem do impulso nervoso e, assim, levando à morte. As hepatotoxinas desencadeiam uma hemorragia intrahepática, podendo levar o paciente a morte com ingestão de pequenas quantidades. A primeira hepatotoxina descrita foi isolada de *M. aeruginosa* (Carmichael, 1992), sendo caracterizada como heptapeptídeos compostos por D-alanina (D-Ala) na posição 1, duas variações de L-aminoácidos nas posições 2 e 4, ácido D-glutâmico (D-Glu) na posição 6, ácido D-eritro- $\beta$ -metilaspártico (MeAsp ou D-Asp) na posição 3, ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca (Adda) na posição 5 e N-metil dehidrolamina (Mdha) na posição 7 (Dawson, 1998) (Figura 2). Estes compostos são resistentes à fervura e a ataques proteolíticos o que os tornam mais resistentes nos ecossistemas (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001b).



**Figura 2 – Estrutura química geral de MC.** As MC são genericamente compostos cíclicos por 7 aminoácidos, sendo que são diferenciados primariamente nos dois L-aminoácidos nas posições 2 e 4 e pela metilação/desmetilação em MeAsp e MDha. O atípico aminoácido Adda é essencial para expressão da atividade biológica e uma diferente estereoisomeria nas duplas ligações conjugadas, por exemplo, resulta na perda de toxicidade (Lee & Chou, 2000).

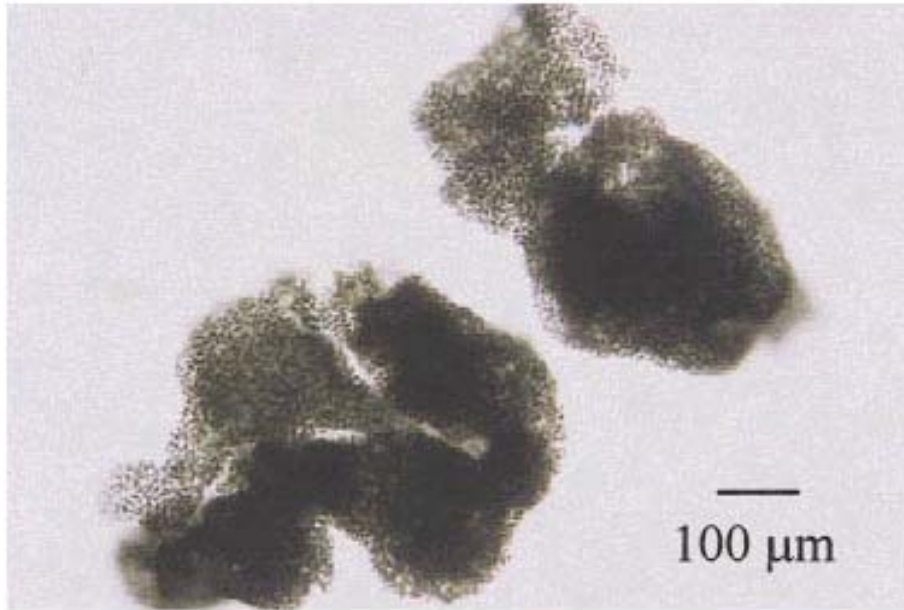
Muitos compostos atuam na modificação sinalizadora celular (fosforilação e desfosforilação) e, estes por sua vez, produzidos por organismos específicos desempenham ação específica de toxinas. Seus efeitos, usualmente em concentrações nM, ilustram a importância deste aspecto na modificação da homeostase celular. Um exemplo de toxinas naturais afetando diretamente a cascata de fosforilação são os ésteres de plantas que promovem a inibição de proteínas quinases C. Um outro grupo caracterizado recentemente de inibidores de fosfatases foi isolado como toxina de dinoflagelado, o ácido ocadáico (OA) (Toivola & Eriksson, 1999).

MC é um potente inibidor de proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A), o qual se liga covalentemente aos resíduos de serina e treonina destas proteínas em eucariotos. Sugere-se que esta toxicidade (*in vitro* e *in vivo*) resulte da ativação de proteínas quinases. Um tipo de MC inibe PP1 e PP2A com  $IC_{50}$  em torno de 0,1 a 1 nM (Gehring, 2004) afetando a sinalização celular e ocasionando alteração estrutural do citoesqueleto (Toivola & Eriksson, 1999). Outro inibidor de fosfatases é o OA que apresenta um  $IC_{50}$  para PP1 de 10nM e de 0,1 nM para PP2A (Toivola & Eriksson, 1999).

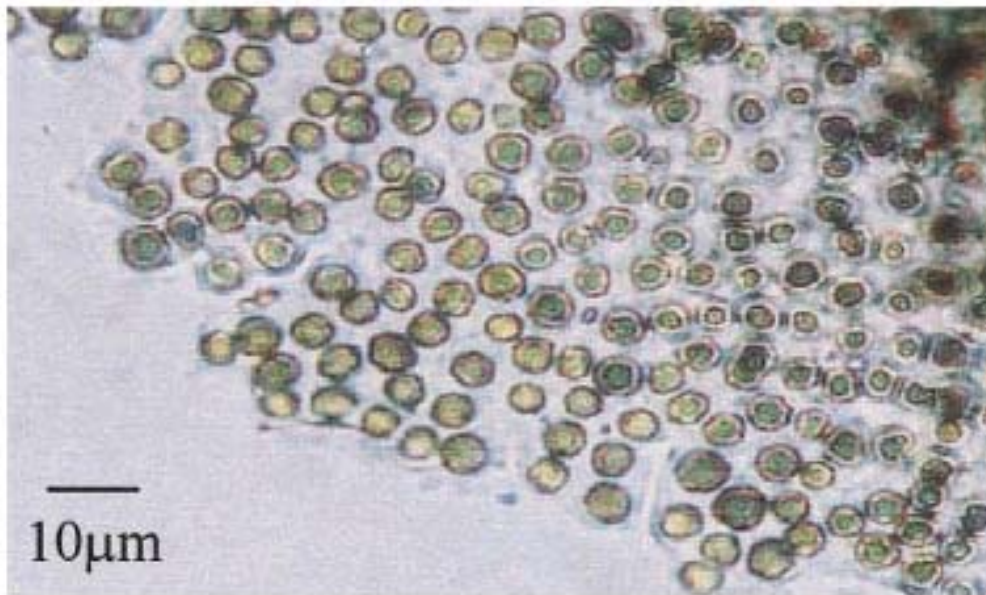
Os mecanismos que levam aos efeitos inibitórios da MC e do OA sobre as proteínas fosfatases do metabolismo celular ainda são confusos. Porém sugere-se que estejam envolvidos na promoção tumoral e, também, na resposta sinalizadora da apoptose (Gehring, 2004).

O Brasil possui um recente histórico de relatos de contaminações por cianotoxinas, porém, muitos não foram comprovados. Um destes eventos ocorreu na Bahia, onde oitenta e oito pessoas morreram devido ao consumo de água proveniente de reservatório de Itaparica, porém não houve comprovação da associação de cianotoxinas à água. Contudo, o caso mais grave envolvendo a população foi a chamada “Síndrome de Caruaru”, ocorrida na cidade de Caruaru, nordeste do Brasil em 1996, quando 76 pacientes em uma clínica de hemodiálise foram a óbito em decorrência do fato da água utilizada estar contaminada por cianotoxinas (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003).

*M. aeruginosa* é um microorganismo aeróbico fotoautotrófico e seus processos vitais requerem água, CO<sub>2</sub>, substâncias inorgânicas e luz. Sua morfologia no meio ambiente é caracterizado pela presença de colônias densas (Figura 3). Em cultivo laboratorial, as colônias se desfazem facilmente em pequenas células envoltas por uma fina substância gelatinosa. O desenvolvimento celular é normal, mas a aglomeração não ocorre como na natureza (Figura 4) (White *et al.*, 2003).



**Figura 3 – Microscopia óptica da colônia de *Microcystis sp.*** A colônia apresenta coloração intensa pelo fato da aglomeração celular. A densidade e presença desta colônia dependem da disponibilidade de nutrientes no ambiente, principalmente nitrogênio e fosfato (White *et al.*, 2003).



**Figura 4 – Microscopia óptica de colônias de *Microcystis sp* em cultivo.**

A colônia apresenta desprendimento das células e a formação de uma fina camada gelatinosa. As mudanças morfológicas evidenciadas em colônias de *M. aeruginosa* ocorrem quando estas são submetidas a diferentes condições de cultivo (White *et al.*, 2003).

## 1.2 – Metabolismo de nitrogênio

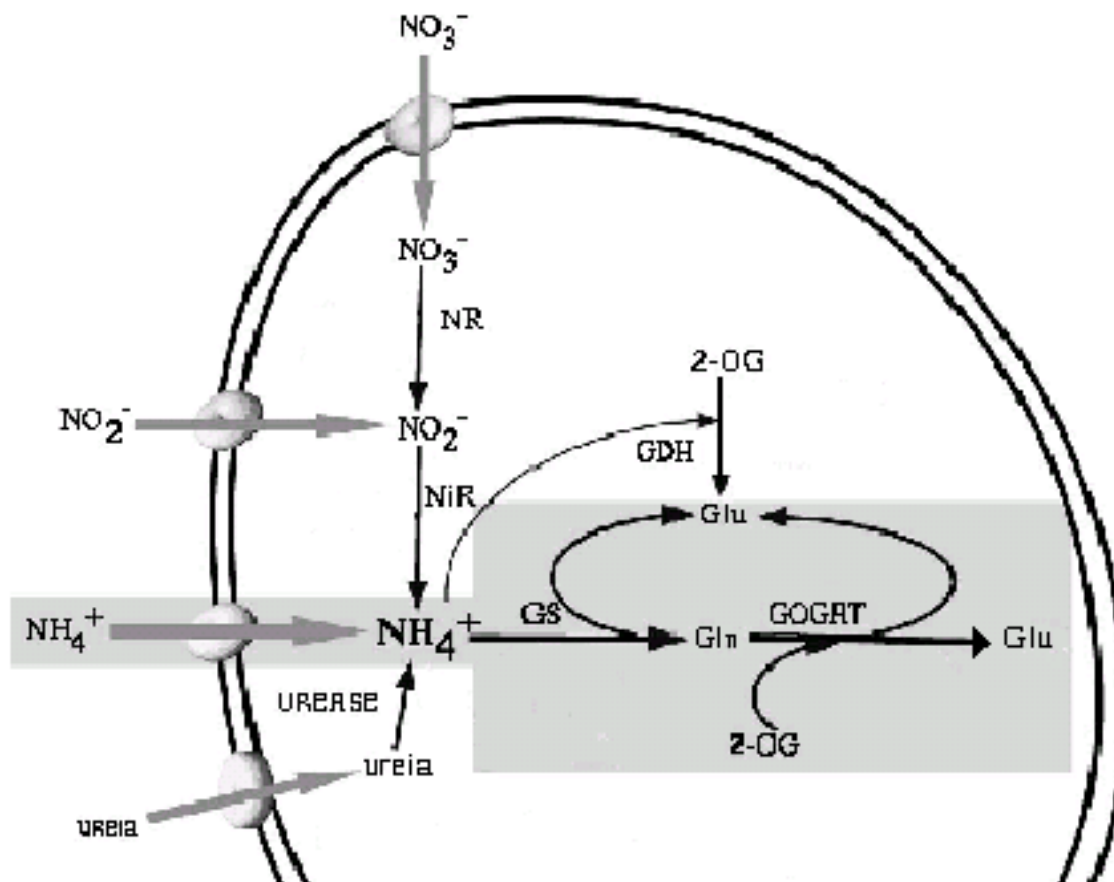
O nitrogênio é um constituinte importante encontrado em compostos de todos os organismos. Os animais não possuem a capacidade de assimilar nitrogênio inorgânico ou de sintetizar a metade dos aminoácidos encontrados nas proteínas, a menos que haja a produção facilitada por bactérias (por exemplo, no rúmen de animais ruminantes) (Lea, 1993).

Embora o nitrogênio seja abundante na atmosfera, apenas bactérias (Lea, 1993) e cianobactérias filamentosas (White, 2000) possuem a capacidade de fixar nitrogênio e sintetizar amônio, requerendo uma elevada carga energética neste processo. Amônio e outras formas de nitrogênio são rapidamente assimiladas pelas cianobactérias, com mínimo esforço metabólico possibilitando, posteriormente, sua assimilação em moléculas biológicas a partir da formação de glutamato (Esquema 1) (García-Fernández & Diez, 2004). A habilidade de síntese de glutamina e glutamato por estes microrganismos é de extrema importância, pois são as únicas formas de incorporação de nitrogênio inorgânico no material celular. O glutamato é requerido na função de amino doador para a síntese de aminoácidos e a glutamina na síntese de purinas, pirimidinas, histidinas, triptofano, asparagina,  $\text{NAD}^+$ , amino-açúcares e p-aminobenzoato (White, 2000).

Nos nódulos de raízes em leguminosas bactérias simbiotes fixam nitrogênio para a planta. Entretanto, na maioria das plantas, o nitrato é a única fonte de nitrogênio, sendo encontrado no solo e absorvido pelas raízes (Lea, 1993). Conseqüentemente, plantas, algas, cianobactérias não filamentosas e numerosos microrganismos necessitam de enzimas para realizar a assimilação de nitrato.



Tais organismos são responsáveis pelo fornecimento de nitrogênio a muitas outras formas de vida heterotrófica em nosso planeta (Nason, 1962).



**Esquema 1 – Via de assimilação de nitrogênio em cianobactérias.** Sugere-se que as cianobactérias sejam capazes de utilizar várias formas de nitrogênio, possibilitando assim uma flexibilidade metabólica deste microorganismo às mudanças ambientais. Todo o nitrogênio inorgânico deve primeiramente ser convertido à amônio, que é incorporado então como um grupo amino no glutamato e na glutamina (GDH – Glutamato Desidrogenase; GS – Glutamina Sintetase; GOGAT – Glutamato Sintase; NR – Nitrito Redutase; NiR – Nitrito Redutase; 2-OG – 2-oxoglutarato). Adaptado a partir de García-Fernández & Díez, 2004.

### **1.3 – Nitrato Redutase: a enzima propulsora do processo de assimilação de nitrogênio.**

A maior fonte de nitrogênio no ecossistema aquático está na forma de nitrato. A redução de nitrato à amônia é um processo fisiológico fundamental em algas, plantas, fungos, cianobactérias e em uma variedade de bactérias, pois o nitrato absorvido não é diretamente assimilado nas vias biossintéticas devendo ser reduzido à amônia (Nason, 1962; Nason, 1963; Berges, 1997).

A passagem de nitrato a nitrito é o primeiro passo para a sua redução à amônia e é catalisada por uma nitrato redutase NAD(P)H-dependente (NR). Esta é a etapa limitante no processo de assimilação de nitrogênio (Nason, 1962; Nason, 1963; Berges, 1997; Beevers & Hageman, 1969). Portanto, a NR é uma enzima de fundamental importância na conversão do nitrogênio inorgânico para a sua incorporação em moléculas biologicamente ativas em organismos fotossintetizantes.

A enzima NR foi inicialmente caracterizada por Evans e Nason (Evans & Nason, 1953) na planta terrestre *Arabidopsis thaliana*. Porém, acreditava-se na existência da NR desde o início do século passado quando Kastle e Elvove, examinando extratos brutos de tubérculo de batata perceberam que o nitrato adicionado era reduzido a nitrito (Kastle & Elvove, 1904). Desde então, a enzima NR tem despertado um interesse intenso na pesquisa científica.

As NR são classificadas em específicas para NADH que ocorrem em plantas e algas; específicas para NADPH presentes em fungos; e, biespecíficas para

NAD(P)H que ocorrem em algumas plantas, principalmente em monocotiledôneas (Miyazaki *et al.*, 1991).

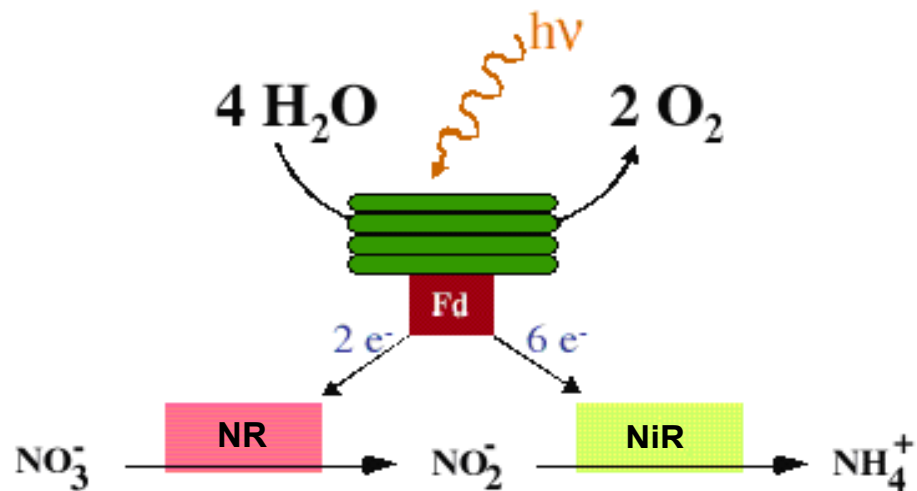
O controle da expressão de NR é em grande parte regulado pela síntese e degradação da própria proteína. A síntese é iniciada pela presença de nitrato e a degradação, pela ausência deste substrato ou até mesmo pela presença de outras formas reduzidas de nitrogênio (Berges, 1997).

A NR de organismos eucariotos é tipicamente um homodímero de alto peso molecular, com cada subunidade composta por peptídeos de aproximadamente 100 kDa associada a molibdênio, molipterina, ferro, heme e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Berges, 1997), que utiliza NAD(P)H como doador de elétrons e contém dois centros enzimáticos distintos que participam seqüencialmente na redução de nitrato a nitrito (Amy & Garret, 1974). Três regiões da enzima são conhecidas: um domínio NAD(P)H, um domínio citocromo b e um domínio FAD, sendo que cada domínio pode funcionar independentemente sob certas condições, tendo por resultado atividades parciais da enzima (Berges, 1997). Em cianobactérias a NR é um monômero formado por polipeptídeo de baixo peso molecular (~80 kDa), que contém como grupo prostético um “cluster” de Fe-S e molibdênio como cofator enzimático (Flores *et al.*, 2005).

Em cianobactérias a enzima NR (EC 1.7.7.2) (Mikami & Ida, 1984) está parcialmente associada à membrana tilacóide e utiliza ferredoxina reduzida fotossinteticamente ou flavodoxina como doador de elétrons fisiológico, embora possa também aceitar elétrons provenientes de doadores artificiais, como NADH e NADPH. O complexo entre NR e ferredoxina é eletrostaticamente estável pela

interação de resíduos de lisina e arginina da NR com os grupos carregados negativamente da ferredoxina (Hirasawa *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005).

A conversão de nitrato a amônia ocorre em 2 etapas: o nitrato é reduzido a nitrito pela NR, reação catalisada pela NR em presença de potencial redutor (ferredoxina ou até mesmo através NAD(P)H). Em seguida, o nitrito é reduzido a amônio pela NiR (Esquema 2), uma enzima ferredoxina-dependente contendo um cluster de Fe-S e siroheme como grupo prostético (Flores *et al.*, 2005). O amônio, altamente tóxico, é rapidamente assimilado a biomoléculas nitrogenadas.



**Esquema 2 – Processo de redução do nitrato a amônio.** A redução de nitrato para amônio é realizada por muitas bactérias, fungos, algas, plantas e cianobactérias através de duas reações seqüenciais catalisadas, respectivamente, pelas enzimas nitrato e nitrito redutase (NiR). Adaptado a partir de Flores *et. al.*, 2005.

A NR catalisa o fluxo ou o total de nitrato reduzido para organismos fotossintetizantes, porém depende de: (a) disponibilidade de substrato no citoplasma (concentrações de nitrato e NAD(P)H) e (b) níveis de NR funcionais (quantidade do polipeptídeo de NR e a disponibilidade de cofatores e íons metálicos-FAD, heme, Ferro e Molibdênio). Cada processo é regulado diretamente ou indiretamente e os níveis totais de nitrato reduzido são controlados através da relação de glutamina, glutamato e nitrato intracelulares, sendo provavelmente estes que direcionem os níveis de redução do nitrato, conseqüentemente atividade de NR (Campbell, 1999). Os modos de regulação sugeridos na literatura que controlam a atividade da NR estão ilustrados no Esquema 3.

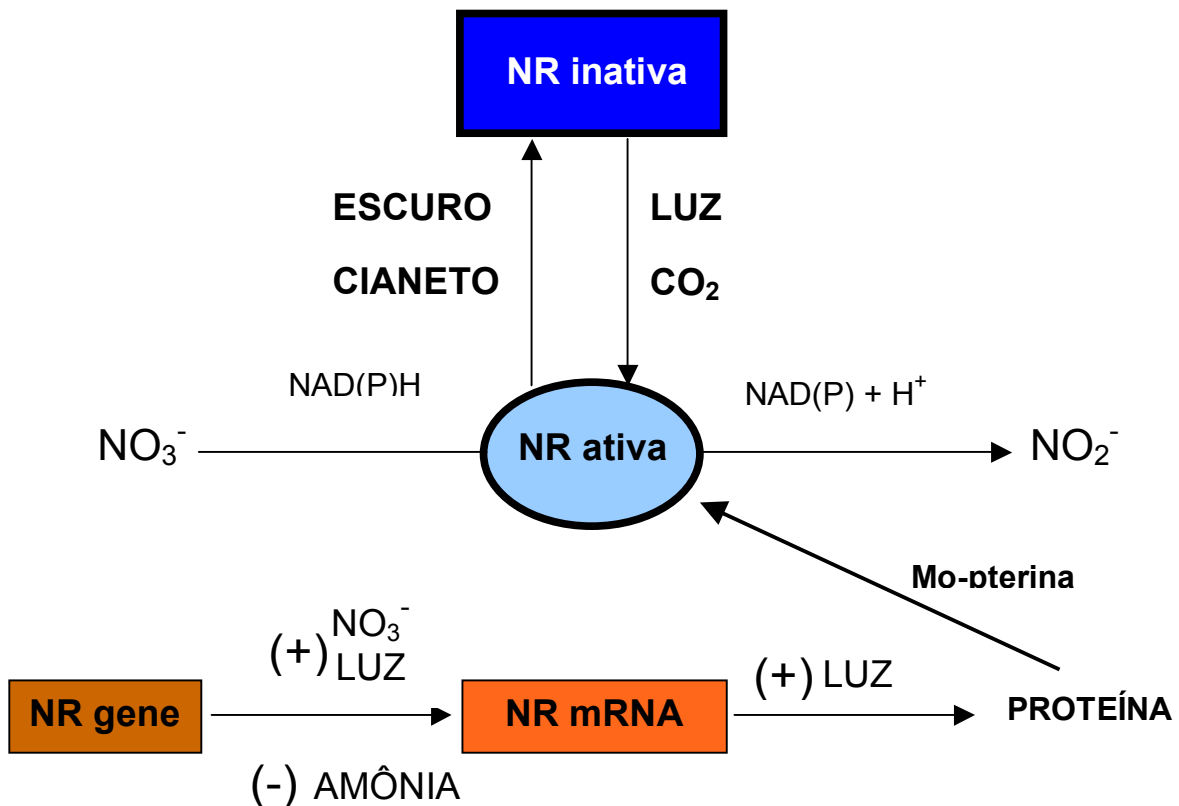
O nitrato atua, essencialmente, como um hormônio em organismos fotossintetizantes pela indução funcional de NR e, também, na expressão de outras enzimas e proteínas, envolvidas nas respostas metabólicas da disponibilidade de nutriente que induzem mudanças, principalmente na raiz (como o desenvolvimento de novas regiões de absorção). A expressão de genes transportadores de nitrato também é induzida por nitrato (Campbell, 1999).

A disponibilidade de amônio como fonte alternativa de nitrogênio inibe o processo de assimilação de nitrato em diatomáceas (Thompson *et al.*, 1989), fungos (Nicholas *et al.*, 1954), plantas superiores (Ferguson & Bollard, 1969), e também em algas (Syrett & Morris, 1963; Lopes *et al.*, 1997). Nestes casos a amônia é assimilada preferencialmente quando ambos, nitrato e amônia estão disponíveis. A regulação por fontes de nitrogênio, como amônia, parece operar em três níveis distintos: (1) inibindo enzimas chave como a NR; (2) pelo bloqueio nos

processos de transporte; e (3) pelo controle da quantidade de enzimas assimilatórias pela diminuição ou aumento da renovação destas proteínas (Franco *et al.*, 1988).

A atividade da NR também pode ser regulada por mecanismos de modificação pós-tradução. A fosforilação está bem caracterizada em plantas e é um mecanismo rápido e reversível, desempenhando um importante papel na modulação da atividade de NR em resposta a sinais de luz e carbono (Huber *et al.*, 1992). Em cianobactérias a atividade de NR é regulada pela transcrição da proteína repressora NtcA. Quando amônio está disponível intracelularmente, a expressão de todas as enzimas e transportadores envolvidos na assimilação de nitrogênio (transportadores de nitrato e nitrito, NR, NiR, etc.) são reprimidos pela NtcA. Somente após a depleção de amônio, as vias de assimilação de outras fontes de nitrogênio são ativadas (García-Fernández & Diez, 2004; Flores *et al.*, 2005). A requisição de uma proteína (PII) que se liga em componentes essenciais para a assimilação de nitrato como permeases, por exemplo, parece regular a atividade de NR. Sugere-se que a ligação de PII ocorra somente com elevação nos níveis intracelulares de carbono ou nitrogênio (Flores *et al.*, 2005).

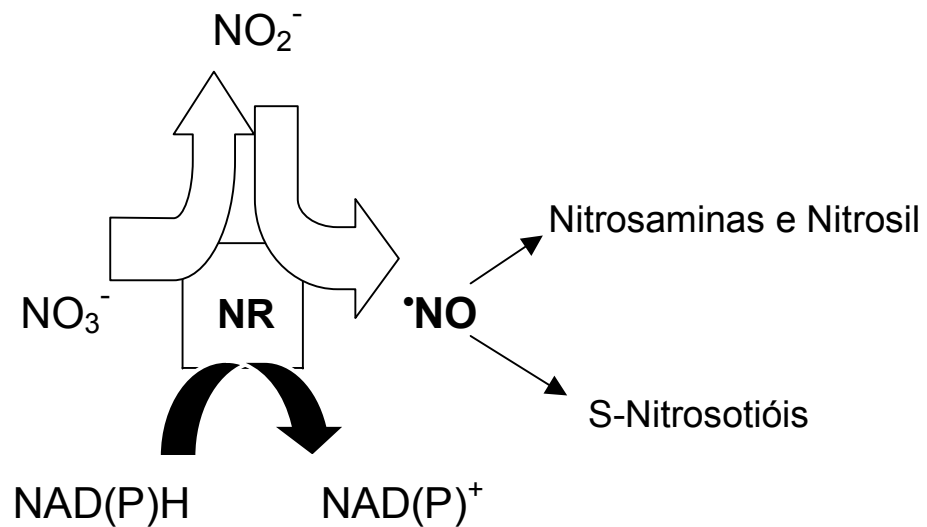




**Esquema 3 – Modos de regulação da NR.** – Os vários modos de regulação da NR indicados incluem regulação da síntese da enzima por efetadores positivos (como nitrato e luz) (Berges, 1997) e por efetadores negativos derivados da amônia (como a glutamina). Inativação reversível da NR por cianeto e condições de escuro e, ativação, por luz e  $\text{CO}_2$  (Flores *et al.*, 2005; García-Fernández & Díez, 2004) ((+) ativação; (-) inibição).

#### 1.4 – Geração de radicais de nitrogênio.

Normalmente, o nitrito está presente em organismos fotossintetizantes como produto da reação catalisada pela NR ferredoxina-dependente (em cianobactérias) e é eficientemente reduzido a amônia pela NiR. Esta redução requer a forma reduzida da ferredoxina, que é fornecida pela atividade do sistema fotossintético via transporte de elétrons da oxidação da água no PS II e da redução do NADP<sup>+</sup> no PS I. Conseqüentemente, o nitrito não se acumula nas células sob condições de luminosidade, quando a fotossíntese produz equivalentes reduzidos. Porém, em uma situação de inibição da NiR, poderia ocorrer a produção de óxido nítrico ( $\bullet$ NO), uma vez que nitrito acumulado intracelularmente induz a produção de  $\bullet$ NO via NR como sugerido em experimentos realizados usando a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Esquema 4) (Sakihama *et al.*, 2002).



**Esquema 4 – Produção de  $\text{NO}$  induzida por nitrito.** A redução de nitrito a  $\text{NO}$  via NR é um processo que ocorre somente com o acúmulo intracelular de nitrito, tal condição foi obtida pela inibição da NiR em *Zea mays*. A quantificação da formação de  $\text{NO}$  é feita de modo indireto (adaptado a partir de Yamasaki & Sakihama, 2000).

O  $\bullet$ NO é uma molécula importante em plantas e animais. Trata-se de um radical livre, molécula que apresenta um elétron desemparelhado e por este motivo atua como oxidante fraco ou como composto redutor. É produzido normalmente pelos organismos vivos e desempenham diferentes ações biológicas estando envolvido em diversos processos patofisiológicos, como neurotransmissão, inflamação, respostas imunes e homeostase vascular (Tuteja *et al.*, 2004). Em mamíferos, é endogenamente produzido por uma forma de enzima denominada Óxido Nítrico Sintase (NOS), expressa em mamíferos na forma constitutiva e indutiva (Meyer *et al.*, 2005).

Nos animais, quando a síntese  $\bullet$ NO ocorre em neurônios do sistema nervoso central, atua como um neuromediador em muitas funções fisiológicas, induzindo a formação de memória, coordenação entre ativação neuronal e fluxo sanguíneo e modulação da dor. No sistema nervoso periférico,  $\bullet$ NO é liberado por uma rede difusa de nervos, em que mediam algumas formas de vasodilatadores e regulam certas funções gastrointestinais, respiratórias e genitourinárias. O  $\bullet$ NO também é gerado em larga escala durante reações imunológicas contribuindo para a citotoxicidade contra células tumorais, bactérias, vírus e outros microorganismos invasores (Tuteja *et al.*, 2004).

Em plantas,  $\bullet$ NO tem sido identificado como um ponto crucial na regulação de vários processos fisiológicos (Yamamoto-Katou *et al.*, 2006), incluindo germinação, maturação de frutos (Tuteja *et al.*, 2004), fechamento estomatal,

crescimento vegetativo e transição floral. Além disso, tem sido demonstrado que o  $\bullet\text{NO}$  atua como um importante mensageiro na defesa das plantas contra agentes patogênicos (Yamamoto-Katou *et al.*, 2006).

A origem de  $\bullet\text{NO}$  em plantas permanece é um tema ainda controverso. Trabalhos recentes indicam que a produção de  $\bullet\text{NO}$  é realizada via NR (Meyer *et al.*, 2005; Yamamoto-Katou, 2006; Wojtaszek, 2000; Desikan *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003) e NOS (Meyer *et al.*, 2005). Em algas e cianobactérias é sugerido que a produção de  $\bullet\text{NO}$  ocorra via NR, com o acúmulo intracelular de nitrito (Mallick *et al.*, 1999; Sakihama *et al.*, 2002). Devido à instabilidade do  $\bullet\text{NO}$ , as formas de detecção ocorrem de modo indireto, ou seja, através de nitroso-compostos e nitrosaminas (produtos da ligação de  $\bullet\text{NO}$  com ferro, tióis, heme e proteínas) (Feelisch *et al.*, 2002).

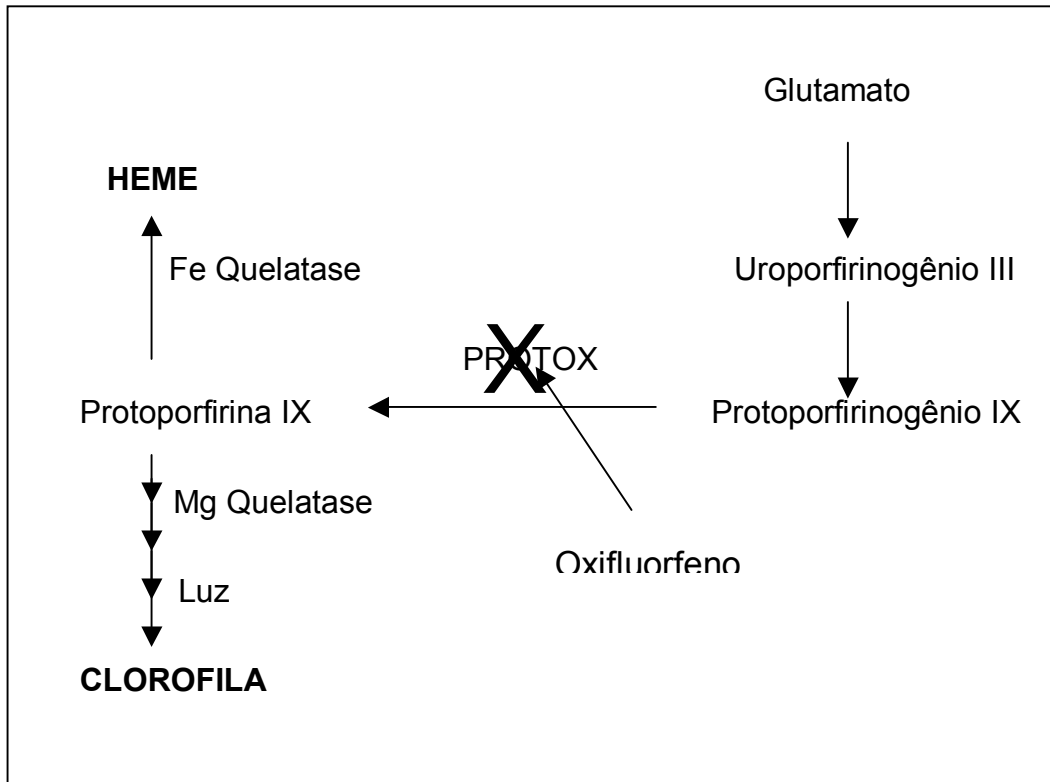
### **1.5 – A utilização de oxifluorfeno como heme-inibidor da NiR, no estudo da produção de $\bullet$ NO via NR.**

A microalga *M. aeruginosa* está exposta a vários poluentes aquáticos que podem causar alterações no seu crescimento e metabolismo. Um exemplo de poluente altamente usado no controle de ervas daninhas em plantações de leguminosas é o oxifluorfeno (éter difenílico). Com o uso recomendado em 7kg/hectare/ano (Geoffroy *et al.*, 2003), quando dissolvido ou absorvido pelo solo pode ser transportado para ambientes aquáticos, sendo assim um risco para os organismos fotossintetizantes, pois, o oxifluorfeno atua como um forte inibidor na biossíntese da clorofila e do grupamento heme (formador de heme-enzimas, como a NiR), inibindo a enzima PROTOX (Protoporfirinogênio IX Oxidase). A PROTOX atua na transformação do protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX (precursor destas sínteses) (Esquema 5) (Scrano *et al.*, 2002; Geoffroy *et al.*, 2003).

A alteração na atividade da PROTOX sugere um acúmulo de protoporfirinogênio IX e a oxidação não enzimática deste composto ocasionaria o acúmulo de protoporfirina IX, tendo este uma forte propriedade na geração de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), uma espécie reativa de oxigênio (ERO). Conseqüentemente,  $O_2^{\bullet-}$  poderia induzir a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) via atividade de Superóxido Dismutase (SOD), permitindo que  $H_2O_2$  difunda-se para diferentes compartimentos celulares, acarretando em diversas alterações, tais como alteração nas membranas de cloroplastos, no transporte de

prótons para formação de ATP e possíveis inibições na fixação de CO<sub>2</sub>, ocasionando assim diminuição no desenvolvimento do organismo fotossintetizante (Geoffroy *et al.*, 2003).

Para o estudo da formação de  $\bullet$ NO via NR se faz necessário a utilização de um heme-inibidor, para que se possa acumular nitrito e assim evidenciar a produção de  $\bullet$ NO.



**Esquema 5 – Síntese de clorofila e heme.** A síntese de clorofila e heme inicia-se a partir do glutamato, este sofre diversas reações até ser formado o protoporfirinogênio IX, via PROTOX (Protoporfirinogênio IX Oxidase) ocorre a formação de protoporfirina IX (substrato para a formação de heme ou clorofila). Com a adição de Oxifluorfenol, a enzima PROTOX é inibida, ocasionando uma inibição na formação de heme e clorofila. Adaptado a partir de Velini *et al.*, 2005.



## 2. OBJETIVOS

No desenvolvimento desta dissertação visamos de modo geral o estudo de uma enzima importante no metabolismo de nitrogênio (NR) em *M. aeruginosa*, que possibilite a compreensão do desenvolvimento e toxicidade desta microalga em reservatórios de água, sendo assim, uma importante ferramenta utilizada na inibição do crescimento de cianobactérias. Neste sentido, a caracterização bioquímica parcial da NR e o estudo da produção de  $\bullet\text{NO}$  via NR foram realizados.

Para atingir estes objetivos abordamos:

- Manutenção e crescimento da microalga em condições adequadas de nutrientes, luz e temperatura;
- Medidas de  $K_M$  para  $\text{NO}_3^-$ , NADPH e NADH;
- Estimativa do pH ótimo da reação de NR;
- Determinação da temperatura ótima de reação da NR;
- Curvas de inibição do crescimento com Oxifluorfeno e cálculos de  $\text{IC}_{20}$  para o herbicida;
- Medidas da produção de  $\bullet\text{NO}$ ;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

**3.1 - Reagentes** – Os reagentes foram adquiridos dos seguintes fornecedores:

**AMRESCO** – Cloreto de Sódio.

**BAKER** – Carbonato de Cálcio.

**CINÉTICA QUÍMICA** – Ácido Bórico.

**CODEX** – Hidróxido de Sódio.

**DOW AGROSCIENCES INDUSTRIAL LTDA.** – Éter difenílico (Oxifluorfenol).

**MERCK** – Fosfato de Potássio Monobásico Anidro, Sulfato de Ferro Heptahidratado, Sulfato de Cobre Pentahidratado, Ácido Sulfúrico.

**MERCK-USP** – Etanol.

**PROTON-RESEARCH** – Nitrito de Sódio.

**REAGEN** – Sulfato de Zinco.

**SIGMA** – Fosfato de Sódio Monobásico Hidratado, Fosfato de Sódio Dibásico Anidro, Nitrato de Potássio,  $\beta$ -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – NADH (forma reduzida),  $\beta$ -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato – NADPH (forma reduzida), Glicina, Sulfanilamida (SULFA), n-naftiletilenodiamina (NED), Nitrato de Sódio, Ácido Etileno Diamino Tetraacético (EDTA), Cloreto de Manganês, Albumina Bovina (BSA), Comassie Blue G.

**SYNTH** – Sulfato de Magnésio.

**VETEC** – Cloreto de Cálcio.

**3.2 – Cultivo da cianobactéria** – A cianobactéria *M. aeruginosa* foi coletada e isolada pela Profa. Dra. Maria do Carmo Oliveira Bittencourt (Esalq-USP) em dezembro de 1996 na lagoa das Garças, em um corpo d'água ornamental localizada no PEFI (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga). O cultivo iniciou-se com  $10^4$  células por mL, em incubadoras (Precision Scientific – Dual Program Illuminated Incubator 818) com fotoperíodo de 12/12 LD (claro/escuro), com a temperatura ajustada para  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e a intensidade luminosa durante o período diurno de  $120 \mu\text{E}$ . O meio de cultura utilizado foi o BG-11 (meio enriquecido com vitaminas, fosfato e nitrato) (Rippka *et al.*, 1979).

**3.3 – Curva de crescimento** - A curva de crescimento realizada baseou-se na fluorescência *in vivo* de clorofila (Campbell *et al.*, 1998) e na contagem celular. Estimou-se a densidade celular através do método de fluorescência, com a excitação da clorofila a 460 nm e emissão em 680 nm. A área do intervalo de fluorescência entre 660 e 700 nm é correspondente à densidade celular relativa à emissão de clorofila, quantificadas em Fluorímetro (HITACHI, modelo F-4500). Na contagem celular foi utilizada a câmara de Neubauer, com células fixadas em lugol, utilizando-se microscópio óptico (NIKON, modelo Eclipse E-600).

Para a determinação da curva de crescimento foram analisadas alíquotas retiradas da cultura entre a 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> hora de luz, durante 20 dias.

**3.4 – Preparação do extrato bruto** - A extração de proteína total solúvel foi efetuada com cerca de 300 mg de alga ( $10^6$  células por mL) coletadas na 6ª hora de luz (Lopes *et al.*, 1997) no 12º dia e, imediatamente, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer ( $-80^\circ\text{C}$ ). A estabilidade da enzima foi verificada após realizarem-se ensaios em amostragens frescas e armazenadas, comprovando-se atividade inalterada de NR.

No momento do uso, as amostras foram ressuspensas em 2 mL de tampão glicina-NaOH 0,2M, pH 10,0. As células foram rompidas por sonicação, em gelo para evitar aquecimento da amostra, com 4 pulsos de 15 s cada. Os intervalos entre os pulsos foram de 20 seg. A suspensão foi centrifugada a 12.500 rpm, por 5 min, a  $4^\circ\text{C}$  e, o sobrenadante (extrato bruto) coletado e mantido a  $4^\circ\text{C}$  para uso posterior (Chapman & Harrison, 1988). As concentrações de proteína total foram estimadas pelo método Bradford, utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão (Bradford, 1976).

**3.5 – Medidas da atividade de NR** - A atividade enzimática da NR foi estimada no extrato bruto utilizando-se o protocolo de ensaio enzimático para NR descrito anteriormente por Ramalho *et al.* (1995). A mistura de reação continha 0,1 mg/mL de proteína total do sobrenadante que foi incubado com o nitrato de sódio (0,4 mM), o cofator sulfato de magnésio (1,7 mM) e o agente redutor NADH (1,5 mM) ou NADPH (1,6 mM). A mistura de reação (extrato protéico,  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{MgSO}_4$ ) foi incubada a  $40^\circ\text{C}$  por 5 min, para manutenção do equilíbrio de temperatura. Após tal incubação promovemos a adição do agente redutor (NADH

1,5 mM ou NADPH 1,6 mM) e a reação foi monitorada em tempos de 5, 10, 20, 30 e 60 min. A reação foi interrompida com a adição de sulfato de zinco (concentração final de 18 mM) e etanol (concentração final de 0,4 mM), que desnaturam a enzima.

A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 5 s para a deposição do material sólido. Ao sobrenadante foi adicionado sulfanilamida 5mM (SULFA, 1.0% em HCl 10%) e n-naftiletilenodiamina 0,65 mM (NED) para formação do complexo colorido com  $\text{NO}_2^-$ , com absorvância em 543 nm. Este método de quantificação de  $\text{NO}_2^-$  é muito sensível e não é afetado pela presença de outros constituintes no ensaio enzimático (Grasshoff *et al.*, 1983).

A unidade de atividade específica de NR é calculada com o número de  $\mu\text{mol}$  de nitrato reduzido por minuto por mg de proteína (U/mg). Os valores de absorvância medidos no Espectrofotômetro (HITACHI, modelo U-200) a 543 nm foram convertidos em concentração de  $\text{NO}_2^-$  usando-se uma curva de calibração. A curva padrão de calibração para  $\text{NO}_2^-$  foi confeccionada utilizando-se a faixa de concentração de 0,25 a 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$  em presença de SULFA e NED nas concentrações indicadas acima (Chapman & Harrison, 1988). Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.6 - Temperatura ótima de ensaio** – Estimou-se a temperatura ótima de ensaio da NR, sob as seguintes temperaturas de incubação: 10°C, 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C e 60°C. Os extratos brutos foram preparados como descritos no item 3.4. As condições de ensaio enzimático estão descritas no item 3.5 e os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.7 - pH ótimo de ensaio** – Estimou-se o pH ótimo de atividade da NR utilizando-se os tampões fosfato e glicina-NaOH variando-se os pHs dos tampões como demonstrado na Tabela 1. Para a verificação do pH final de ensaio, utilizamos padrões (Color Coded Buffer Solution – Thomas Scientific) para os pHs 7 (29 mM NaOH; 49 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 10 (24,8 mM NaHCO<sub>3</sub>; 24,8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), estabilizando assim o pHmetro (Digimed, modelo DM20).

A preparação do extrato bruto foi feita como descrito no item 3.4 e os ensaios foram realizados em triplicata.

<b>TAMPÃO, M</b>	<b>pH</b>	<b>pH final de ensaio</b>
Fosfato, 0,2	6,0	6,0
Fosfato, 0,2	7,0	7,0
Fosfato, 0,2	8,0	8,0
Glicina-NaOH, 0,2	9,0	9,0
Glicina-NaOH, 0,2	9,5	9,5
Glicina-NaOH, 0,2	9,75	9,75
Glicina-NaOH, 0,2	10	10
Glicina-NaOH, 0,2	10,25	10,25
Glicina-NaOH, 0,2	10,5	10,5

**Tabela 1 – Tampões utilizados nos ensaios de NR.** A atividade de NR foi verificada como descrito no item 3.5, alterando somente o pH e tampão de ensaio, mantido em temperatura constante de 40°C.

**3.8 – Determinação de  $K_M$  aparente para  $\text{NO}_3^-$**  - Um importante parâmetro bioquímico é a medida da constante de Michaelis-Menten para a NR com relação a  $\text{NO}_3^-$ . Para tanto, para a determinação do  $K_M$  aparente para  $\text{NO}_3^-$  as concentrações do substrato variaram de 0,1 a 1 mM. A extração da NR e o ensaio enzimático foram realizados como descritos nos itens 3.4 e 3.5 alterando-se somente a concentração do  $\text{NO}_3^-$ . As condições de ensaio foram realizadas em 5 min com adição de NADH (1,5 mM) ou NADPH (1,6 mM), na temperatura de 40°C e pH ótimo de ensaio de 10,0. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.9 – Determinação de  $K_M$  aparente para NADPH e NADH** – Estimou-se também a constante de Michaelis-Menten para os doadores de elétrons NADH e NADPH. Para a determinação do  $K_M$  aparente para o NADPH e NADH as concentrações variaram de 0,1 a 8 mM (NADPH) e 0,05 a 20 mM (NADH). A extração e o ensaio enzimático foram realizados como descritos nos itens 3.4 e 3.5 alterando-se somente a concentração do poder redutor. As condições de ensaio foram realizadas em 5 min com adição de NADH (1,5 mM) ou NADPH (1,6 mM), com temperatura de 40°C e pH ótimo de ensaio 10,0. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.10 – Inibição da atividade de NR usando cianeto** – É sabido na literatura que cianeto inibe efetivamente a NR (Rigano & Aliotta, 1975) e para calcular a concentração inibitória da atividade de NR, utilizou-se de 0,05 a 1,5 mM de cianeto que foram adicionados à reação após a adição do agente redutor (NAD(P)H). A extração e o ensaio enzimático foram realizados como descritos em 3.4 e 3.5. As condições de ensaio foram realizadas em 5 min com adição de NADH (1,5 mM) ou NADPH (1,6 mM), com temperatura de 40°C e pH ótimo de ensaio 10,0. Os ensaios foram realizados em triplicata.



**3.11 – Efeito de oxifluorfeno sobre o desenvolvimento de *M. aeruginosa*.** – As culturas celulares foram submetidas à incubação com concentrações de oxifluorfeno que variaram de 0,5 a 50 µg/L em metanol (Geoffrey *et al.*, 2003). A densidade celular foi determinada em cada cultivo após 48 h de exposição ao herbicida. As amostras foram coletadas e as respectivas leituras de fluorescência da clorofila, efetuadas. A concentração que inibe 20% do crescimento celular foi utilizada nos ensaios posteriores. Nestas condições o oxifluorfeno não fluoresce e, portanto, não interfere nas estimativas de concentração de clorofila. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.12 – Ação do oxifluorfeno sobre grupo heme** – Após a incubação das culturas com oxifluorfeno, foram realizados ensaios para constatar a inibição deste herbicida na síntese de heme-enzimas. Para este experimento foi adicionado 10 µg/L (IC<sub>20</sub>) nos cultivos celulares (10<sup>6</sup> células/mL). Os cultivos foram mantidos com o herbicida por 48 h e utilizou-se catalase (CAT) (heme-enzima) e superóxido dismutase (SOD) (não possui heme em sua composição) para se estimar o efeito de oxifluorfeno sobre a síntese de heme-enzimas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.12.1 - Atividade de SOD** – A atividade da SOD total foi determinada indiretamente, mediante a inibição da redução do citocromo c (Cit c), onde SOD compete com Cit c por  $O_2^{\bullet-}$  gerado pelo sistema hipoxantina/xantina oxidase. Primeiramente verificou-se a taxa de redução do Cit c durante 60 s a 550 nm usando o sistema: Cit c 14,3  $\mu$ M na presença de xantina 1 mM e 2  $\mu$ L de xantina oxidase (25 U/mL) para um volume final de 1 mL. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima suficiente para inibir 50% da redução de Cit c a 25°C em tampão fosfato de potássio 50 mM com 100  $\mu$ M de EDTA, pH 7,8 (Flohé & Ötting, 1971). Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.12.2 - Atividade de CAT** – A atividade da CAT foi determinada monitorando-se a decomposição de  $H_2O_2$  durante 40 s a 240 nm em um sistema contendo  $H_2O_2$  10 mM. Uma unidade de CAT foi definida como quantidade de enzima que catalisa a decomposição de 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  por min a 30°C em tampão fosfato de potássio 50 mM , pH 7 (Aebi, 1984). Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.13 – Ensaio para quantificação de nitrito e nitroso-compostos** – As células de *M. aeruginosa* foram sonicadas previamente como descrito em 3.4 e as concentrações de  $NO_2^-$  e nitroso-compostos foram determinadas após a clivagem reducional destes compostos por uma solução de iodeto/triodeto (iodeto de potássio (KI) 45 mM e de iodo ( $I_2$ ) 10 mM em ácido acético glacial) a temperatura constante de 60°C, sob atmosfera de nitrogênio. Estas condições facilitam as

análises de  $\bullet\text{NO}$ , pois é necessária a formação de uma linha base de detecção, formada pelo fluxo contínuo de nitrogênio. A subsequente determinação de  $\bullet\text{NO}$  liberado ocorreu em fase gasosa pela reação quimioluminescente com o ozônio ( $\text{O}_3$ ).  $\bullet\text{NO}$  reage com  $\text{O}_3$  para formar dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), sendo que uma proporção deste último atinge um estado eletronicamente excitado ( $\text{NO}_2^*$ ) e, ao decair para o estado fundamental, emite luz próximo da região do infravermelho (Feelisch *et al.*, 2002) que pode ser quantificada por um Analisador de  $\bullet\text{NO}$  (NOA).

Para diferenciar as classes de compostos sem ter que mudar soluções ou condições de reação, as amostras podem ser pré-tratadas com grupos específicos de reagentes. As amostras biológicas são tipicamente divididas em três alíquotas: uma usada diretamente para injeção e detecção de  $\text{NO}_2^-$  + nitroso-compostos, outra para pré-incubação com 29 mM de SULFA e detecção de nitroso-compostos menos  $\text{NO}_2^-$  e a última com pré-incubação com  $\text{HgCl}_2/\text{SULFA}$  (com 7,3 mM de  $\text{HgCl}_2$ ) para detecção de nitroso-compostos resistentes ao mercúrio (Feelisch *et al.*, 2002). Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.14 – Quantificação de nitrito** – A adição de SULFA (29 mM) tem sido usada para remover eficientemente o  $\text{NO}_2^-$  de soluções tratadas com ácidos fortes. Sob estas condições, o  $\text{NO}_2^-$  reage com SULFA para formar um íon diazônico estável, este não é reduzido a  $\bullet\text{NO}$ . A quantidade de  $\text{NO}_2^-$  em uma amostra pode ser quantificada pela subtração simples da área de pico das

alíquotas pré-tratadas com SULFA com as alíquotas não tratadas. Uma curva de calibração para  $\text{NO}_2^-$  foi estabelecida com concentrações entre 0,5 e 30  $\mu\text{M}$ , sendo diretamente injetada em NOA, sem sofrer incubações antes da injeção (Feelisch *et al.*, 2002). Os ensaios foram realizados em triplicata.

**3.15 – Quantificação de S-nitrosotióis** – A concentração de S-nitrosotióis presente em uma amostra pode ser convenientemente quantificada pelo cálculo da diferença entre a detecção na presença de  $\text{SULFA}/\text{H}^+$  (correspondente ao índice total de nitroso-compostos) e após o pré-tratamento da amostra com 0,2% de  $\text{HgCl}_2$  (7,3 mM – concentração final) e  $\text{SULFA}/\text{H}^+$  (29 mM – concentração final). A incubação com  $\text{HgCl}_2$  resulta na clivagem de ligações S-NO, sem afetar a forma ou a recuperação do pico de  $\text{NO}_2^-$  ou de  $\bullet\text{NO}$  (Feelisch *et al.*, 2002). Os ensaios foram realizados em triplicata.

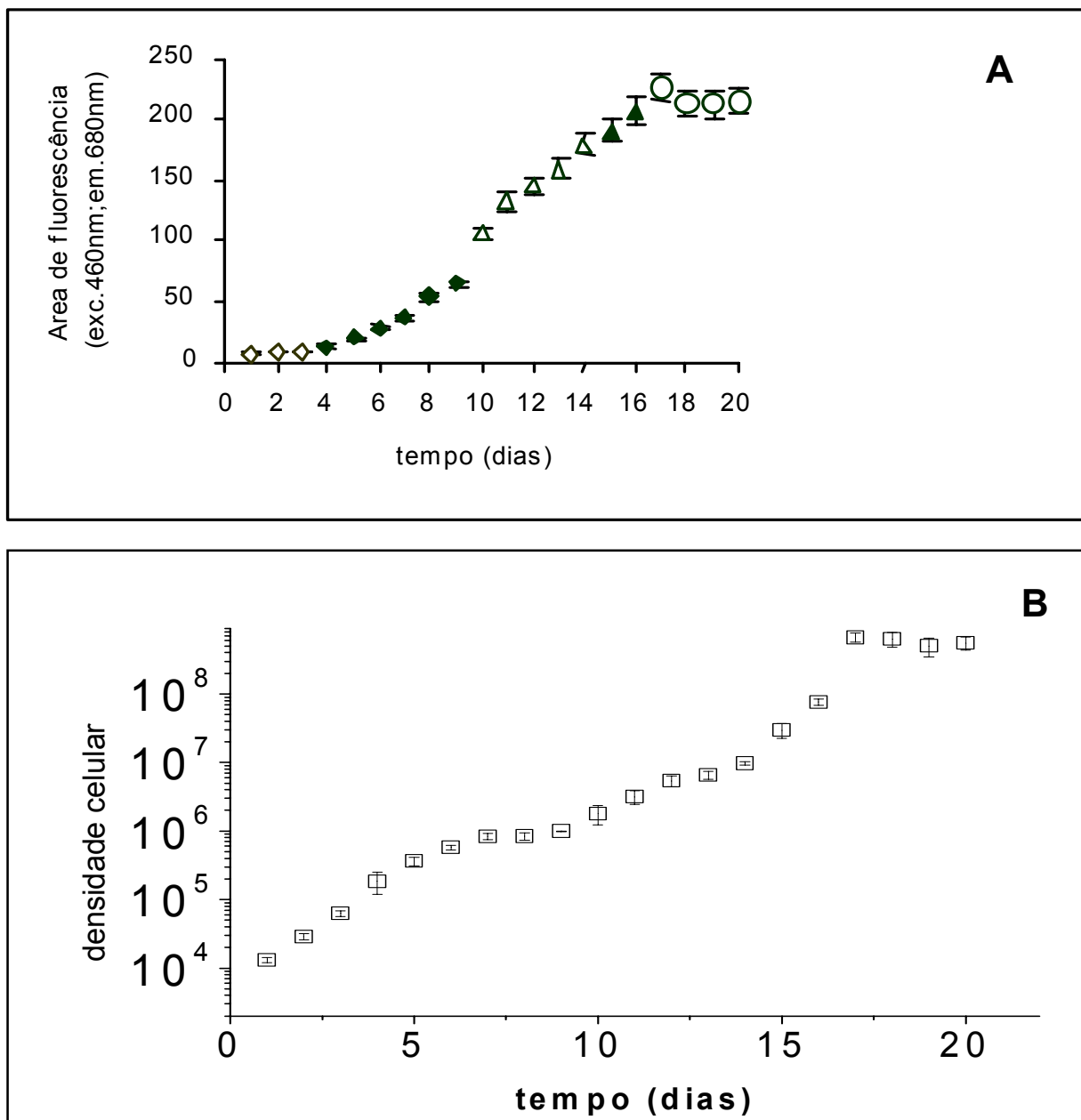
**3.16 – Quantificação de nitrosil e nitrosaminas** – O sinal detectado no NOA nas amostras tratadas com  $\text{HgCl}_2/\text{SULFA}$  (nas concentrações descritas no item 3.15) corresponde às espécies resistentes ao mercúrio, como as nitrosaminas e nitrosil-compostos ( $\bullet\text{NO}$  complexado à heme ou a sítios ferro-enxofre de biomoléculas) (Feelisch *et al.*, 2002). Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 4. RESULTADOS

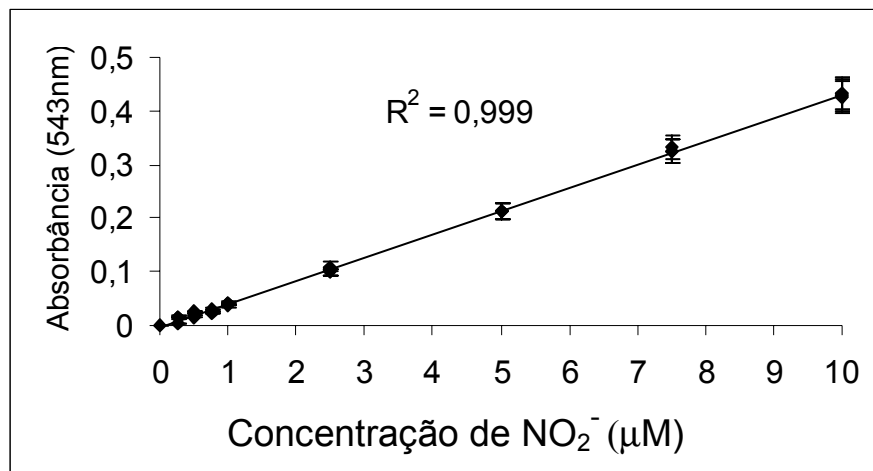
### 4.1 – Caracterização bioquímica da enzima NR.

A determinação do dia de coleta foi obtida através da curva de crescimento (Figura 5), na qual o ideal para a realização dos experimentos foi estabelecido em 12 dias, por trata-se do meio da fase exponencial de desenvolvimento deste microorganismo. Partindo-se de uma densidade inicial de  $10^4$  células por mL iniciou-se a curva de crescimento sendo finalizada após 20 dias. Para a confecção desta etapa, as células foram submetidas à contagem ao microscópio e simultaneamente à fluorescência da clorofila, sendo realizadas em triplicatas (Figura 5). A utilização das duas metodologias para a confecção da curva de crescimento foi de fundamental importância, pois na contagem ao microscópio a técnica baseia-se na fixação das células com lugol, inviabilizando a utilização destas em possíveis experimentos, uma vez que ocorre a morte celular. Entretanto, a utilização da fluorescência possibilita a reutilização das células em experimentos futuros por tratar-se de uma técnica não invasiva. Assim, após a confecção da curva de crescimento os experimentos foram monitorados a partir da fluorescência da clorofila e estimando-se a densidade celular pela a curva previamente estabelecida.

A atividade enzimática específica de NR é calculada como número de  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_3^-$  reduzido por min por mg de proteína, mas se faz necessária a confecção da curva padrão de calibração de  $\text{NO}_2^-$  (produto da redução de  $\text{NO}_3^-$ ) para o cálculo de atividade específica da NR. Como pode ser observado pela curva obtida na Figura 6, a linearidade do método utilizado é muito boa.



**Figura 5 – Curvas de crescimento de *M. aeruginosa*.** O crescimento de *M. aeruginosa* foi acompanhado por fluorescência (A) onde a excitação dos cultivos foi em 460 nm e a emissão em 680 nm. As contagens celulares (B) foram estimadas em microscópio óptico. Os cultivos foram mantidos como descrito no item 3.2 e a confecção destas curvas no item 3.3 de Materiais e Métodos. Os ensaios foram realizados em triplicata.



**Figura 6 – Curva padrão de nitrito.** Diferentes concentrações de  $\text{NO}_2^-$  são incubadas com os agentes reveladores NED e SULFA nas condições descritas no item 3.5 de Materiais e Métodos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

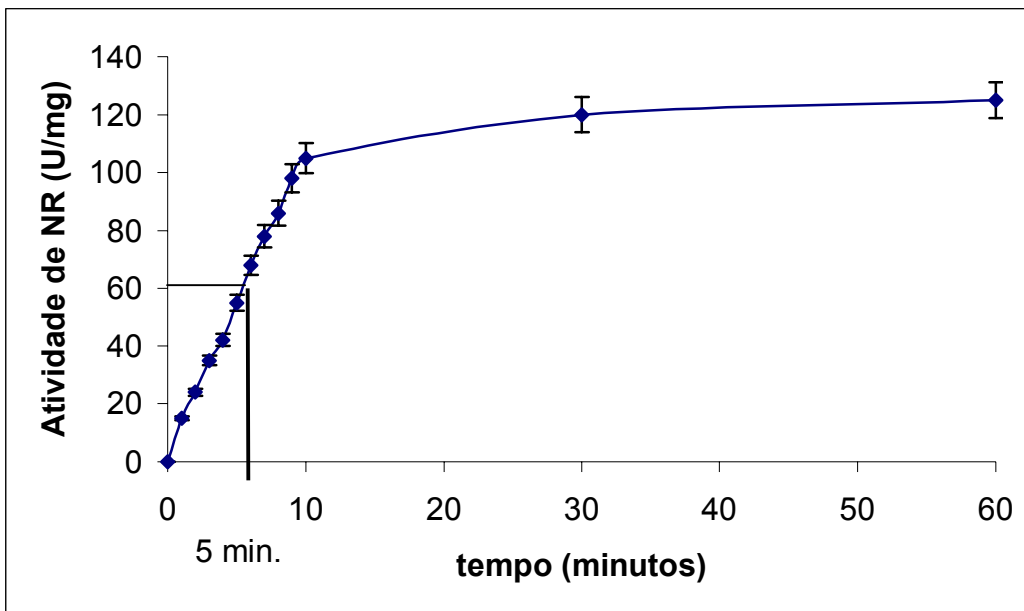
Em face destes experimentos, foi escolhido o tempo de reação de 5 min, o que garante uma cinética adequada de reação (Figura 7). Nas condições experimentais usadas, NR responde linearmente até aproximadamente 10 min, em seguida a reação atinge um patamar de saturação. Após este resultado realizamos os demais ensaios enzimáticos de NR em 5 min.

Para otimização da atividade de NR, foi necessário estimar a temperatura e pH ótimos de ensaio enzimático. Para tanto as verificações ocorreram em tempo estimado de reação (5 min), juntamente com a mistura reacional, descrito em 3.5 de Materiais e Métodos.

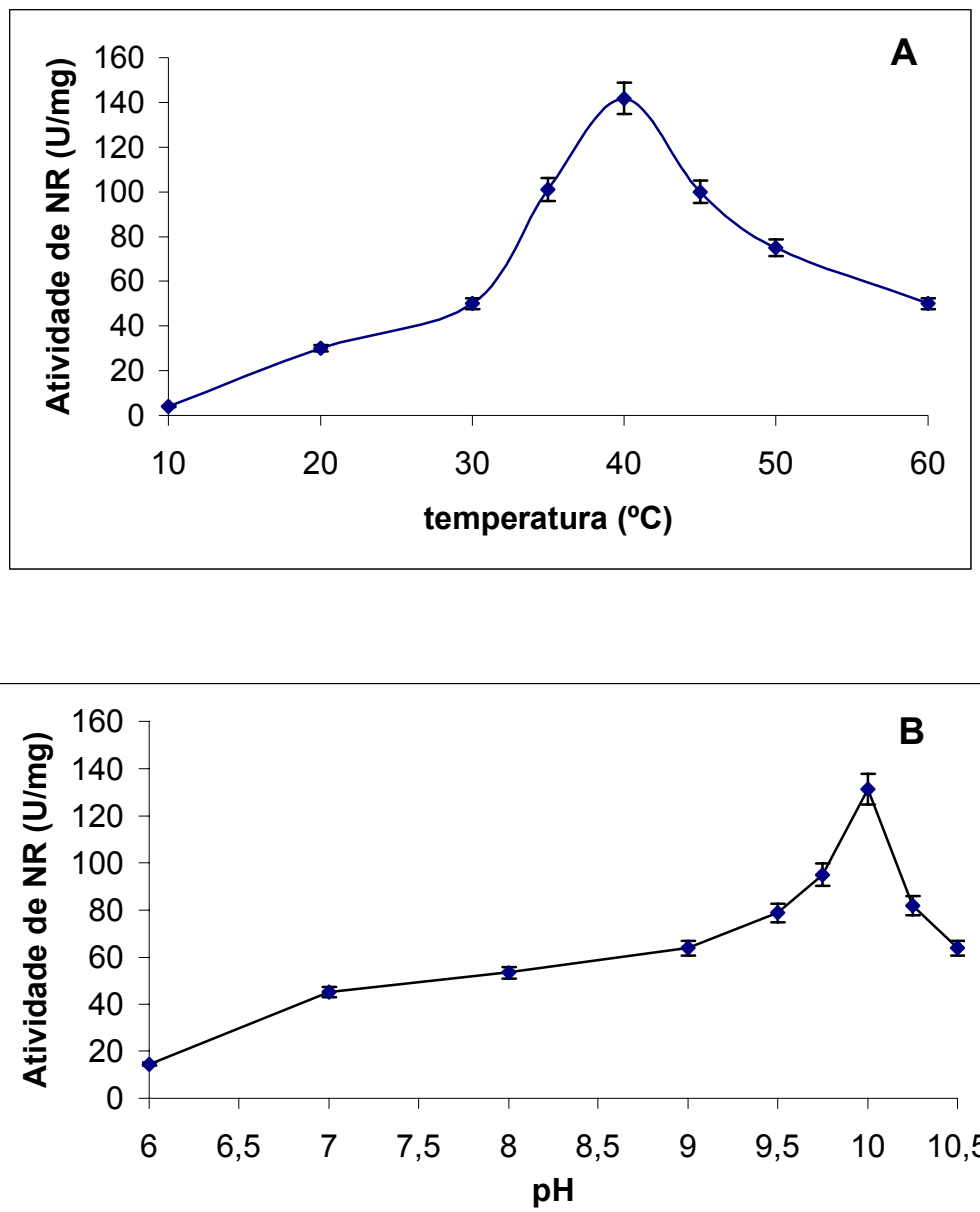
Como mostra na Figura 8A, observa-se que NR em *M. aeruginosa* apresenta uma faixa de temperatura ampla de atividade entre 30° a 60°C, tendo como temperatura ótima 40°C. Em relação à condição ótima de ensaio em pH, verifica-se que o pH ótimo encontra-se entre 9,5 e 10,5, sendo que pH 10 apresentou-se com atividade máxima para NR em relação às demais condições (Figura 8B). A partir destes resultados os demais experimentos para NR foram realizados em 5 min de reação em pH 10 e a 40°C.

Para a determinação do  $K_M$  para  $\text{NO}_3^-$ , as condições de ensaio foram realizadas com descritas nos itens 3.4 e 3.5 de Materiais e Métodos, porém seguindo as condições anteriormente analisadas, tempo de reação em 5 min, pH 10 e temperatura de 40°C, variando somente a concentração de  $\text{NO}_3^-$ . Observa-se que o valor de  $K_M$  para  $\text{NO}_3^-$  em *M. aeruginosa* é de 0,6 Mm (Figura 9).

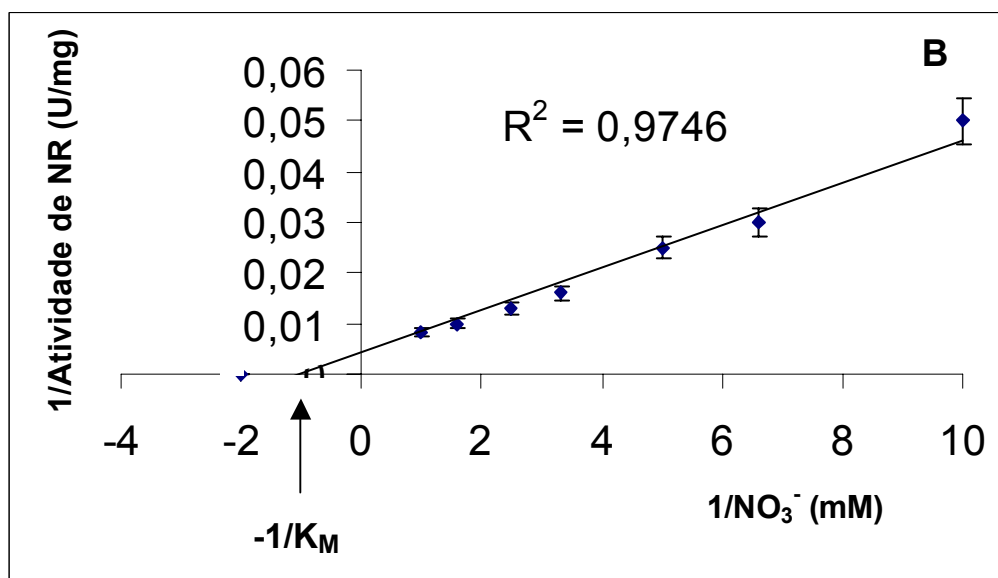
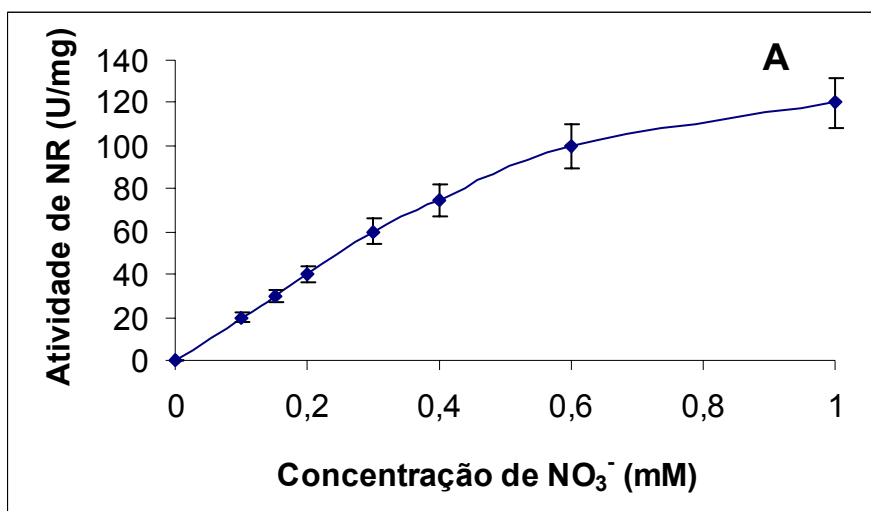




**Figura 7 – Curva de atividade de NR.** A cinética enzimática da NR foi realizada em intervalos de 1 a 60 minutos. Mediante a esta, realizamos os demais experimentos com 5 min de reação. As reações foram interrompidas e o  $\text{NO}_2^-$  produzido foi revelado na presença de NED e SULFA como descrito no item 3.5 de Materiais e Métodos. Os pontos indicam médias de 3 repetições.

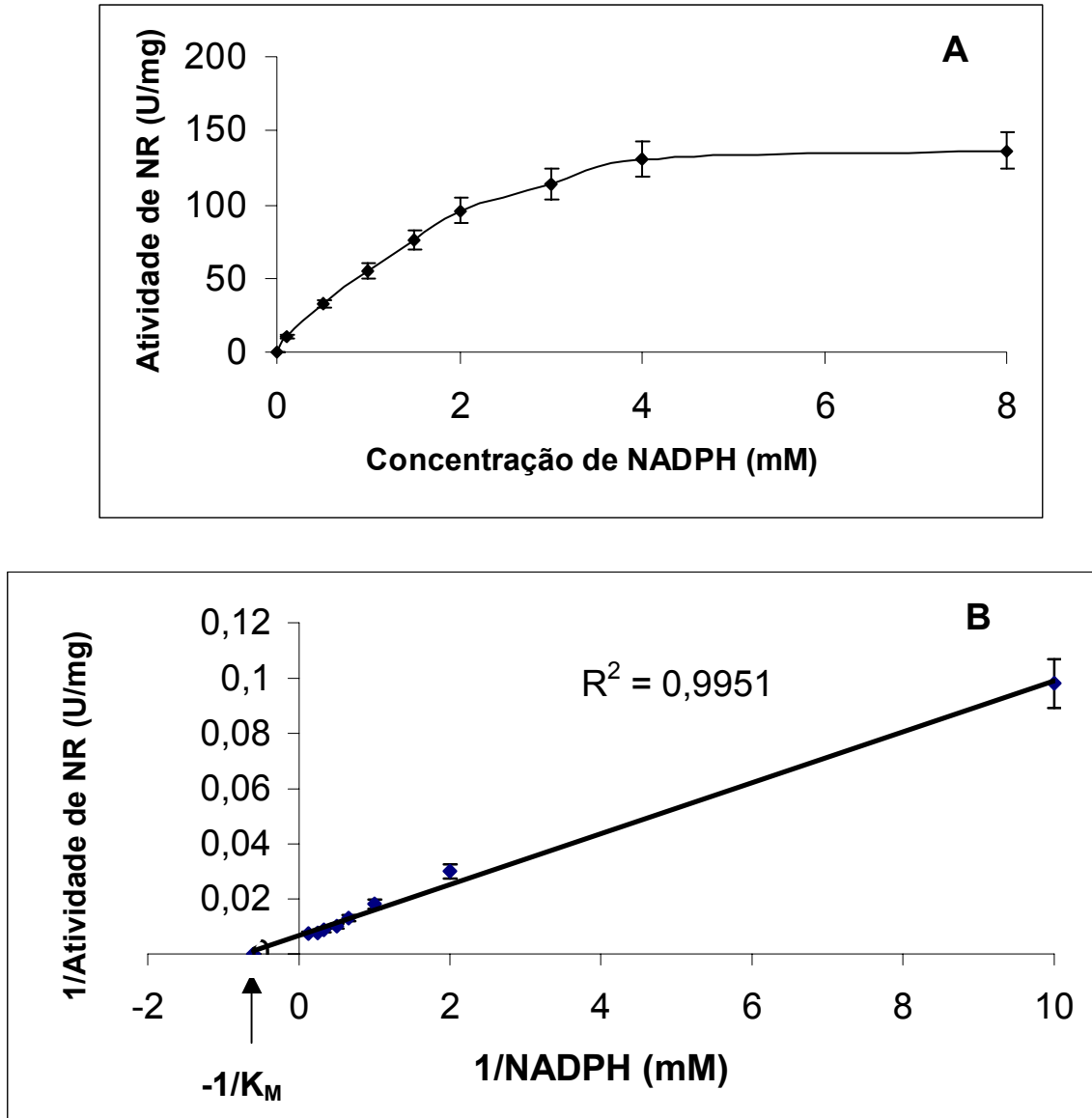


**Figura 8 – Determinação dos ótimos de pH e de temperatura da NR de *M. aeruginosa*.** Os ensaios enzimáticos foram realizados com variação da temperatura (A) em pH 10 constante e variou-se o pH com temperatura constante de 40°C (B) pela reação com NED e SULFA, como descrito no item 3.5 de Materiais e Métodos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

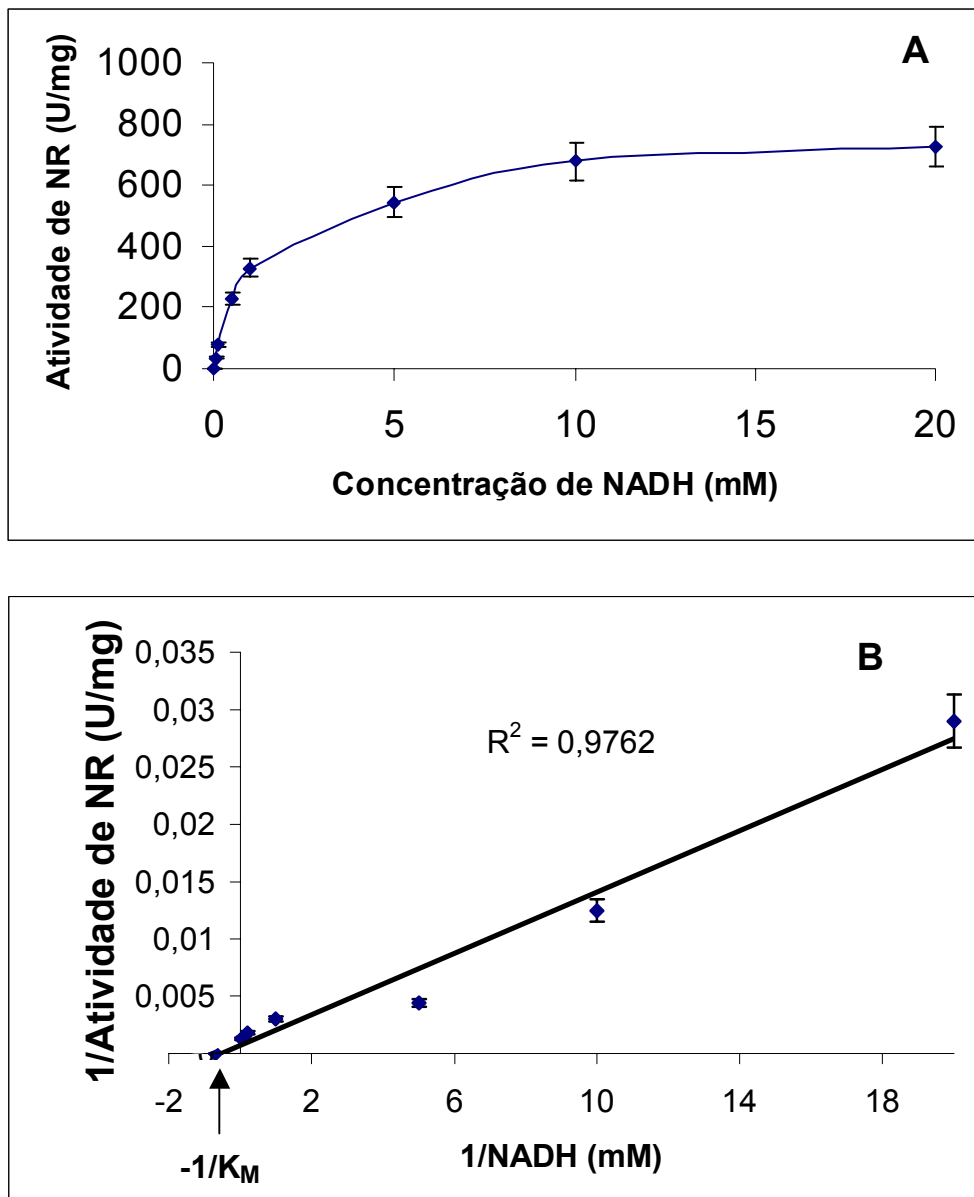


**Figura 9 – Determinação do  $K_M$  aparente de NR para  $\text{NO}_3^-$**  – Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito no item 3.8 de Materiais e Métodos, variando o  $\text{NO}_3^-$ . Evidencia-se uma cinética clássica de Michaelis-Menten (A) e uma regressão linear de Lineweaver-Burk desta cinética (B).

O teste de especificidade da NR para fonte doadora de elétrons revelou que a enzima é biespecífica, ou seja, utiliza tanto NADH quanto NADPH como potencial redutor. Para a determinação das condições de ensaio da NR em *M. aeruginosa*, o  $K_M$  para o potencial redutor foi verificado e distinguida uma possível afinidade por um dos agentes redutores, NADH ou NADPH. Como pode ser observado a NR é capaz de receber elétrons provenientes de NADH e NADPH. Os valores calculados de  $K_M$  para ambos doadores de elétrons são de 1,5 mM para NADPH (Figura 10) e 1,6 mM para NADH (Figura 11). Esta proximidade de valores indica que a *M. aeruginosa* utiliza na redução de  $\text{NO}_3^-$  tanto NADH quanto NADPH, dependendo provavelmente da sua biodisponibilidade intracelular e momentos metabólicos que a alga está.



**Figura 10 – Determinação de  $K_M$  aparente de NR para NADPH.** Os ensaios foram realizados como descritos no item 3.9 de Materiais e Métodos, juntamente com as condições ótimas de ensaio anteriormente estabelecidas, houve somente a variação na concentração de agente redutor. Demonstra-se uma cinética clássica de Michaelis-Menten (A) e uma regressão linear de Lineweaver-Burk (B). Os ensaios foram realizados em triplicata.



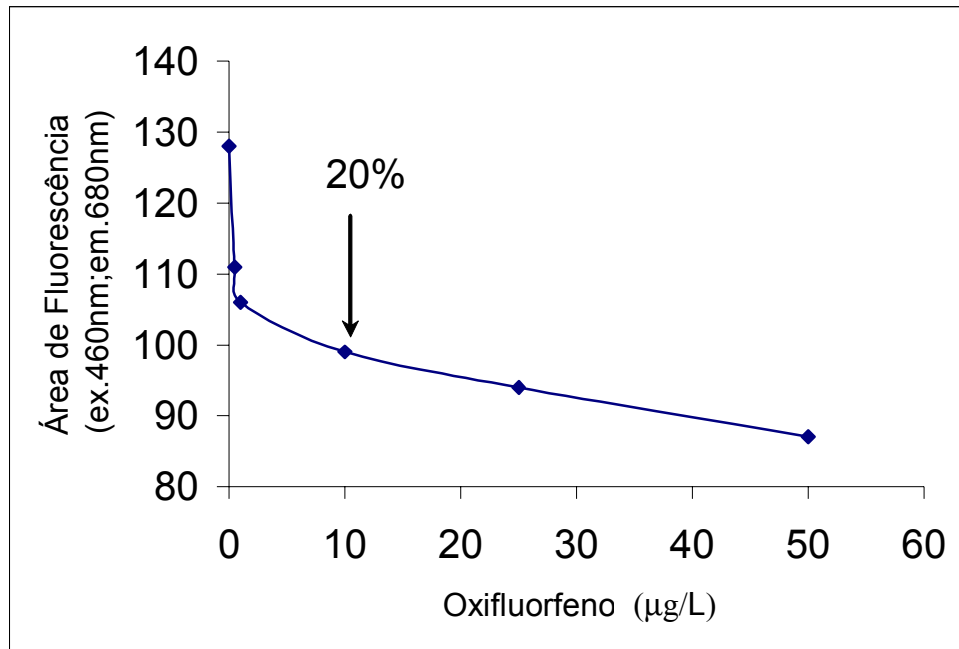
**Figura 11 – Determinação de  $K_M$  aparente para NADH** – Os ensaios foram realizados como descritos em 3.9, juntamente com as condições ótimas de ensaio anteriormente estabelecidas, houve somente a variação na concentração de agente redutor. Demonstra-se uma cinética clássica de Michaelis-Menten (A) e uma regressão linear de Lineweaver-Burk (B). Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2 – Exposição ao oxifluorfeno

A concentração de oxifluorfeno suficiente para inibir 20% do desenvolvimento da cultura encontrada foi de 10 µg/L, obtida após a incubação por período de 48 h. Nossos controles para este experimento continham a mesma quantidade de material adicionado para dissolver o oxifluorfeno. Os demais experimentos foram realizados com esta concentração de herbicida (Figura 12).

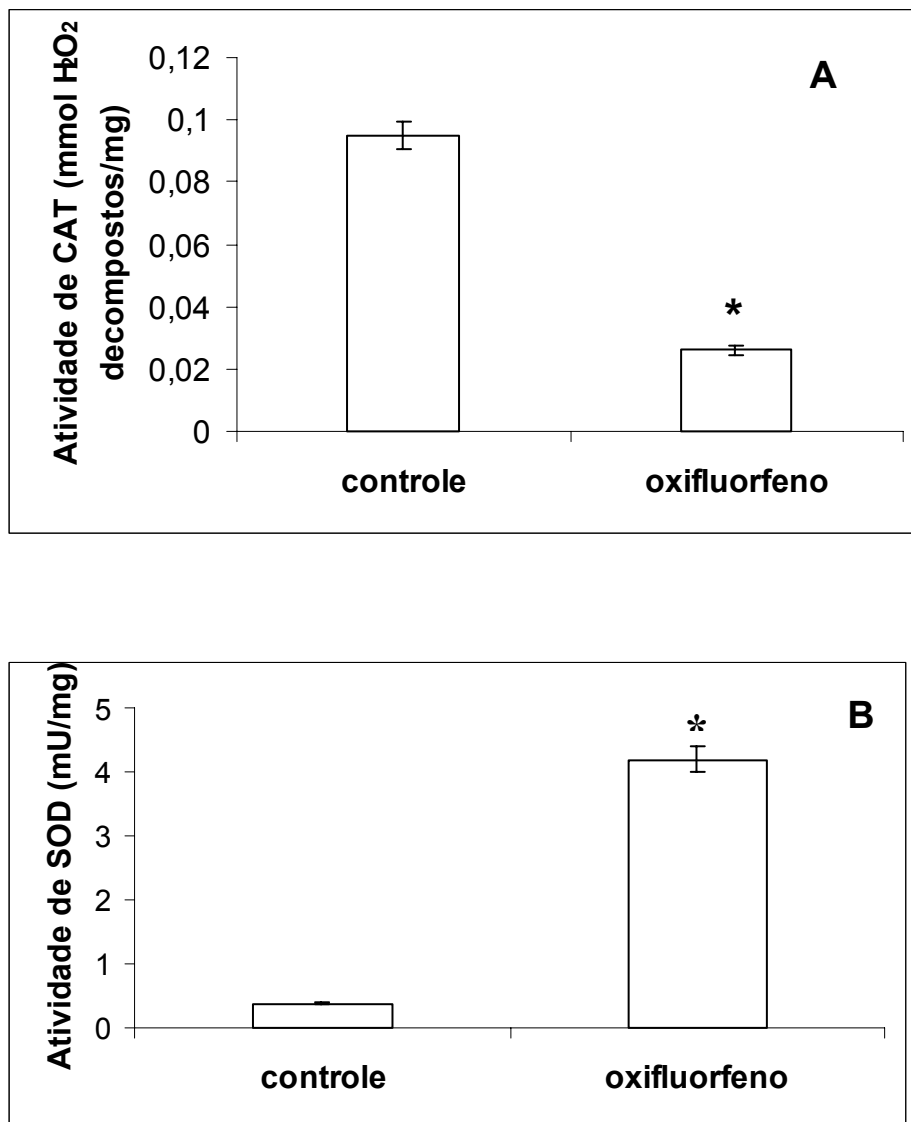
Após a incubação das culturas com oxifluorfeno por 48 h, foram realizados ensaios para constatar a inibição deste herbicida na síntese de heme-enzimas (Figura 13). Nos ensaios desenvolvidos com CAT (heme-enzima) a atividade desta foi reduzida em cerca de 80%, porém a atividade de SOD (não é uma heme-enzima) aumentou cerca de 90% na presença do herbicida. Sugerindo então a inibição da síntese de heme-enzimas pelo oxifluorfeno.

O cianeto é um agente extremamente potente para inibir a atividade de NR de vários organismos. A atividade de NR de *M. aeruginosa* em presença de diferentes concentrações de cianeto foi ensaiado para se analisar seu efeito inibitório. Como mostrado na Figura 14, o aumento da concentração de cianeto ocorre a gradativa inibição de NR, sendo que nas condições experimentais testadas, 1,5 mM de cianeto é capaz de inibir 100% da atividade desta enzima.



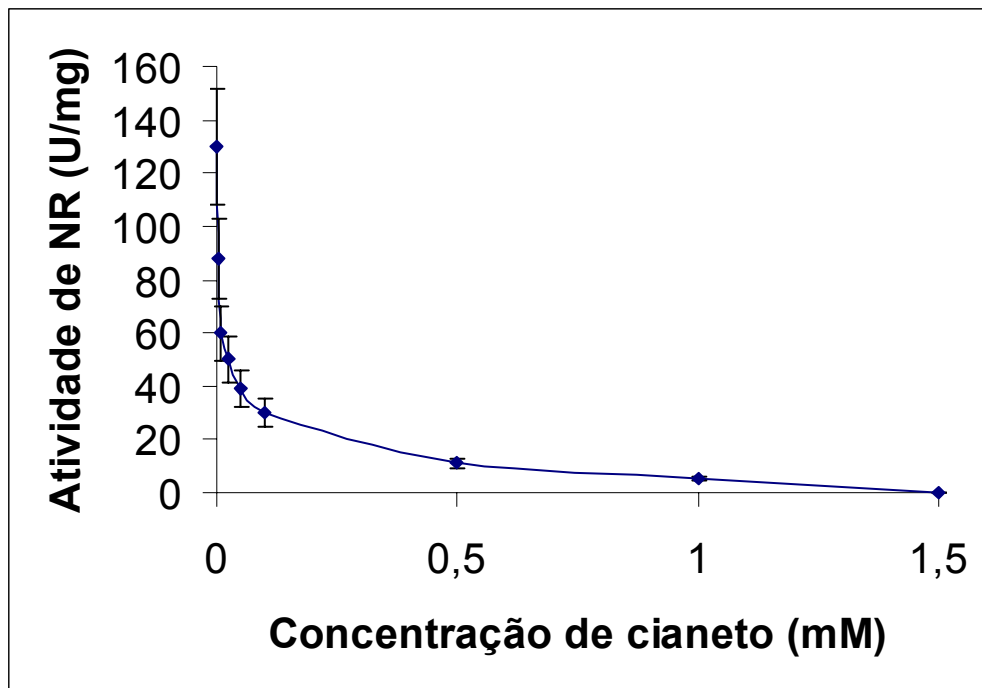
**Figura 12 – Efeitos da exposição da *M. aeruginosa* ao oxifluorfeno.** Os cultivos celulares ( $10^6$  células/mL) foram expostos as diferentes concentrações de oxifluorfeno por 48 h e o seu efeito foi estimado nas amostragens por fluorescência e contagem celular. Os ensaios foram realizados em triplicata.





**Figura 13 – Ação do oxifluorfen na síntese de CAT (heme-enzimas) e SOD.**

Os ensaios antioxidantes de CAT (A) e SOD (B) na presença e ausência do poluente foram realizados como descritos nos itens 3.12.1 e 3.12.2 de Materiais e Métodos. Os ensaios foram realizados em triplicata ( \* ANOVA;  $p < 0,05$ ).



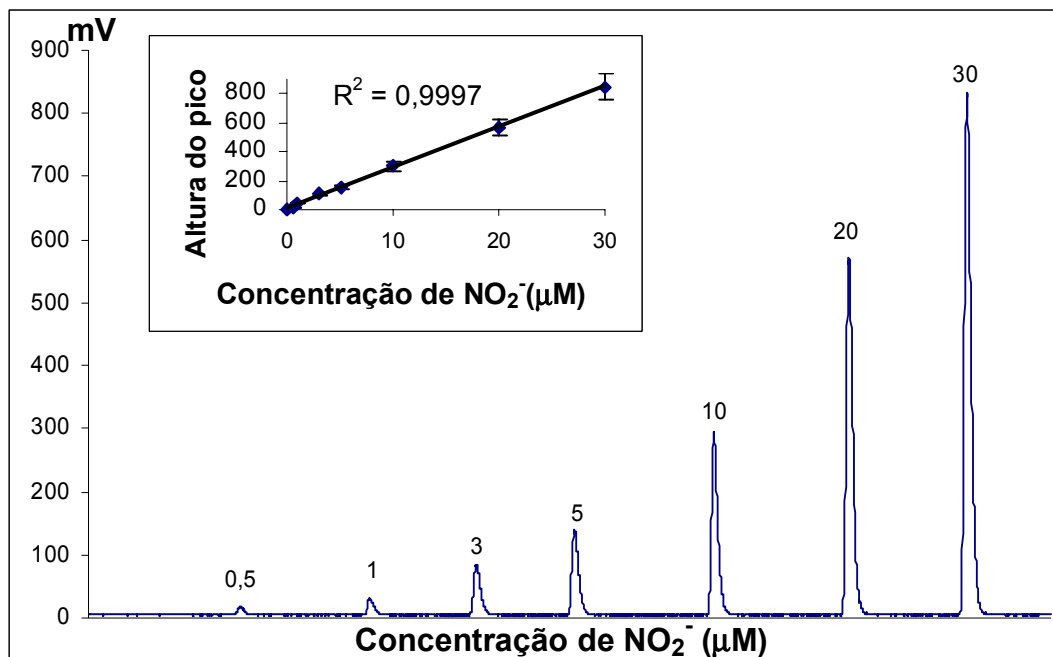
**Figura 14 – Inibição da atividade de NR via cianeto** – Os ensaios de obtenção da concentração de cianeto suficiente para inibir a atividade enzimática, foram realizados como descrito em 3.10, porém para a extração e o ensaio enzimático de NR foram conduzidos como demonstrado nos itens 3.4 e 3.5 de Materiais e Métodos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

De posse dos valores da concentração de oxifluorfeno correspondente ao  $IC_{20}$  como também da concentração para inibição de NR por cianeto, utilizou-se tais concentrações nos experimentos de geração e detecção de  $\bullet NO$  indiretamente via formação de nitroso compostos e nitrosil/nitrosaminas. Para a quantificação destes compostos foi necessária a construção de uma curva padrão de  $NO_2^-$  (Figura 15), uma vez que este é formador de  $\bullet NO$ . Portanto, os experimentos foram realizados com  $10^6$  células por mL, oxifluorfeno ( $10 \mu g/L$ ) e cianeto ( $1,5 \text{ mM}$ ). Como pode ser observado na Figura 15 existe uma larga linearidade no método de detecção de  $NO_2^-$ .

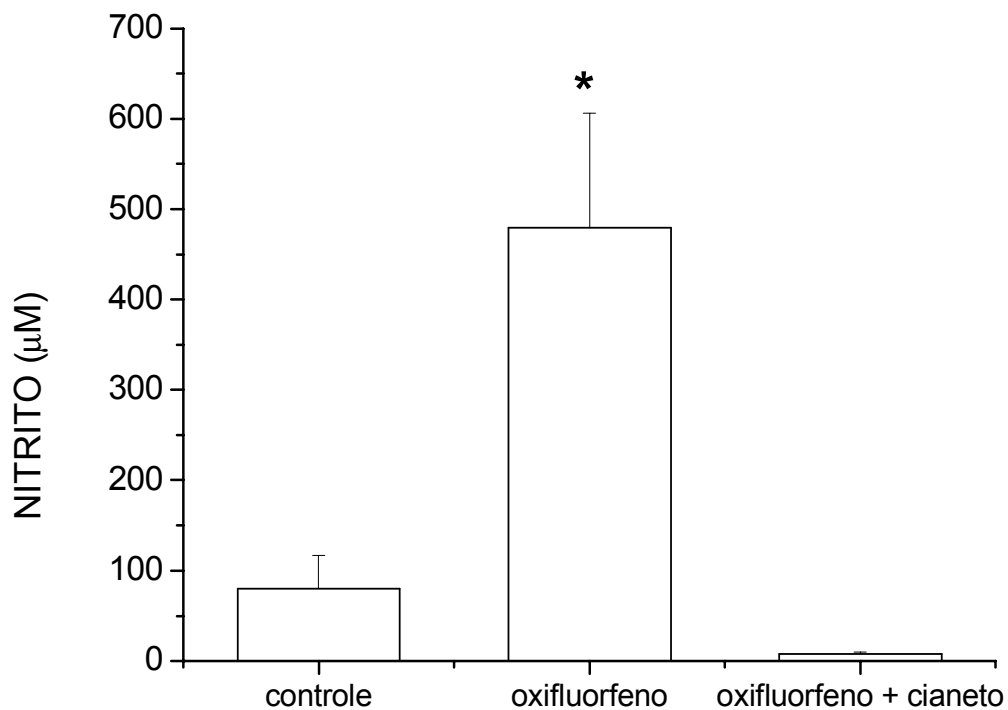
Observa-se na Figura 16 células expostas ao herbicida com um aumento substancial na concentração de  $NO_2^-$  de aproximadamente 6 vezes. O controle (células não expostas ao oxifluorfeno) apresenta uma concentração intracelular de aproximadamente  $100 \mu M$ , enquanto que a presença de oxifluorfeno induz um acúmulo de  $NO_2^-$  em torno de  $600 \mu M$ , tal acúmulo não foi constatado nas células de *M. aeruginosa* incubadas com herbicida e cianeto, tendo a concentração de  $NO_2^-$  estimada em torno de  $20 \mu M$ . Aparentemente sugerimos uma inibição na síntese de heme-enzimas via oxifluorfeno, isso poderia inibir a atividade de NiR, talvez por este fato, ocorra o acúmulo intracelular de  $NO_2^-$  evidenciado pelo o aumento deste (Figura 16). Observa-se na Figura 17 um aumento (aproximadamente 4 vezes) da atividade de NR, tal condição ocorreu pelo o acúmulo intracelular de  $NO_2^-$ , provavelmente ocasionado pela presença de

oxifluorfenol. Não observamos atividade de NR na amostragem contendo o herbicida e cianeto (concentração suficiente para inibir 100% a atividade de NR).

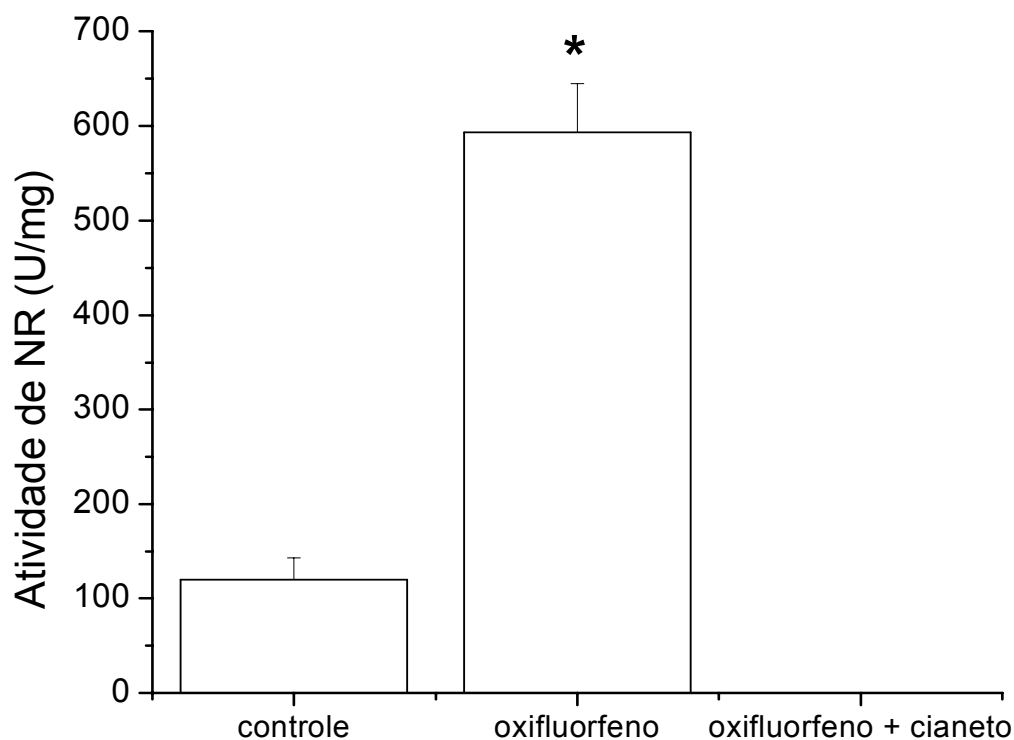
Para a determinação da concentração de S-nitrosotióis e nitrosil/nitrosaminas após a exposição ao oxifluorfenol e cianeto por 48 h, as amostras foram submetidas à pré-incubações como descritos nos itens 3.13, 3.15 e 3.16 de Materiais e Métodos. A elevação nas concentrações de S-nitrosotióis, nitrosil e nitrosaminas sugere um aumento na produção de  $\bullet\text{NO}$ , uma vez que estes são produtos de ligação de  $\bullet\text{NO}$  (Figura 18 e 19). A diminuição na concentração de S-nitrosotióis, nitrosil e nitrosaminas quando as células de *M. aeruginosa* ( $10^6$  células/mL) foram expostas a oxifluorfenol e cianeto sugere a inibição da atividade de NR, pois, a concentração de cianeto utilizada foi suficiente para 100% de inibição da atividade desta enzima (Figura 17).



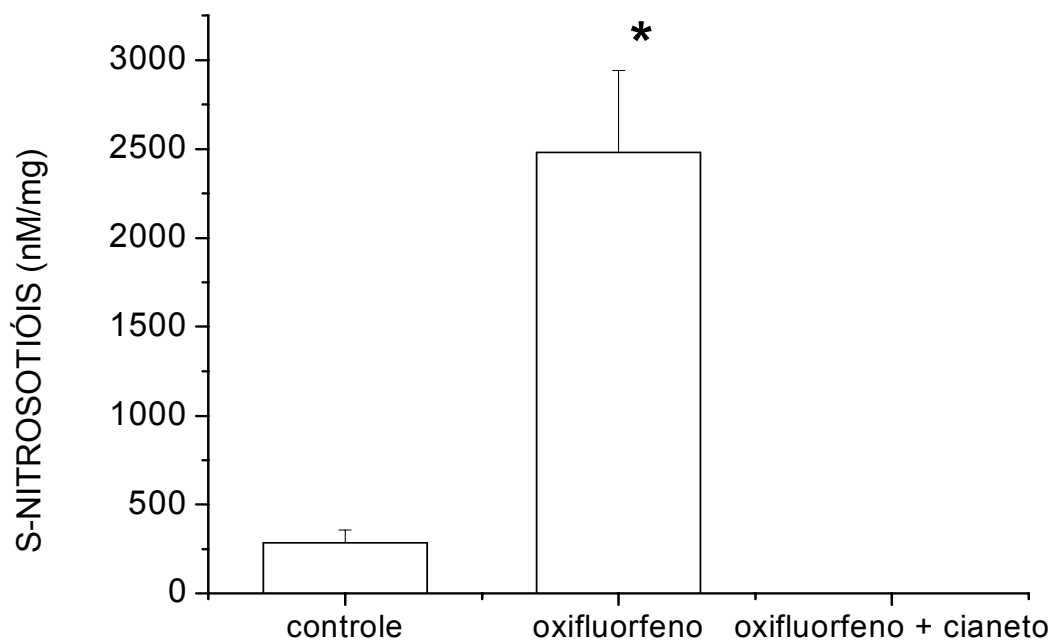
**Figura 15 – Curva padrão de  $\text{NO}_2^-$ .** – A confecção da curva padrão de  $\text{NO}_2^-$ , foi realizada como descrito no item 3.14 de Materiais e Métodos, sendo as amostras injetadas diretamente sem tratamento prévio. No inserte demonstra-se a linearidade do método de detecção do  $\text{NO}_2^-$ . Os ensaios foram realizados em triplicatas



**Figura 16 – Quantificação de  $\text{NO}_2^-$  de *M. aeruginosa* exposta ao oxifluorfen e oxifluorfen + cianeto.** A quantificação de  $\text{NO}_2^-$  após a exposição a oxifluorfen e oxifluorfen + cianeto foram realizados como descrito no item 3.13 de Materiais e Métodos. Porém as amostras foram injetadas diretamente sem tratamento prévio como indicado no item 3.14 de Materiais e Métodos ( \* ANOVA;  $p < 0,05$ ). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

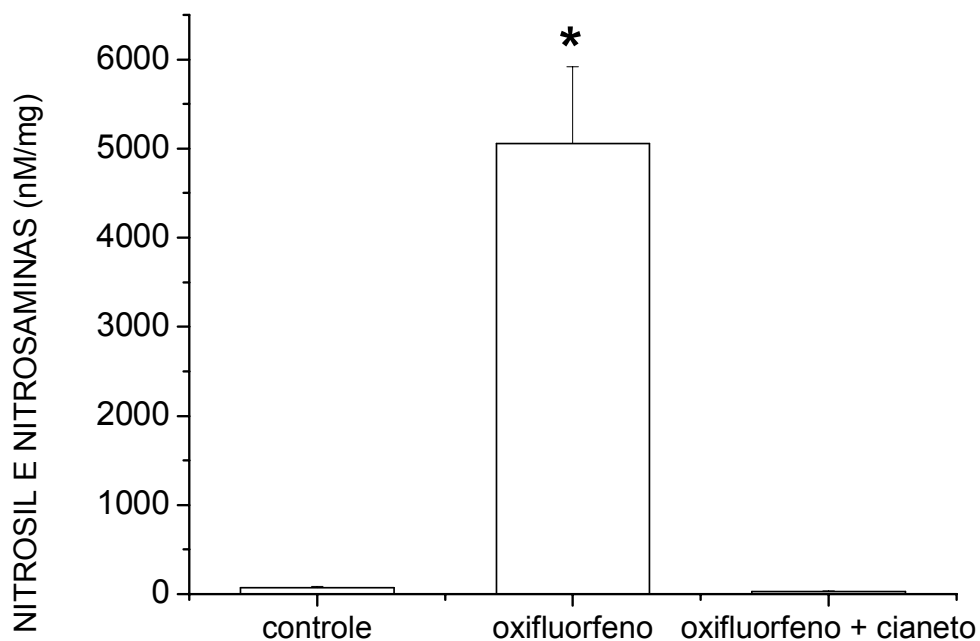


**Figura 17 – Quantificação da atividade de NR submetidas a exposição ao oxifluorfeno.** As células de *M. aeruginosa* ( $10^6$  células/mL) foram expostas ao oxifluorfeno e cianeto + oxifluorfeno em um período de 48 h, posteriormente, sonicadas e desta forma obtendo-se o extrato bruto, na qual foram realizadas quantificações da atividade de NR como descritos nos itens 3.4 e 3.5 de Materiais e Métodos (\* ANOVA;  $p < 0,05$ ). Os ensaios foram realizados em triplicatas.



**Figura 18 – Quantificação de S-nitrosotiois de *M. aeruginosa* exposta ao oxifluorfeno e oxifluorfeno + cianeto.** As concentrações de S-nitrosotiois após a exposição a oxifluorfeno e oxifluorfeno + cianeto foram realizados como descrito no item 3.13 de Materiais e Métodos. Porém as amostras foram injetadas após tratamento prévio como descrito em 3.15 de Materiais e Métodos ( \* ANOVA;  $p < 0,05$ ). Os ensaios foram realizados em triplicatas.





**Figura 19 – Quantificação de nitrosil e nitrosaminas em exposição ao oxifluorfeno.** Para a quantificação de nitrosil e nitrosaminas após a exposição a oxifluorfeno e oxifluorfeno + cianeto foram realizados ensaios como descrito no item 3.12 de Materiais e Métodos. Porém as amostras foram injetadas após tratamento prévio como descrito em 3.15 de Materiais e Métodos ( \* ANOVA;  $p < 0,05$ ). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

## 5. DISCUSSÃO

A estrutura da comunidade fitoplanctônica tende a ser uma mistura de vários grupos de microalgas, porém, a dominância de cianobactérias ocorre com o aumento no biovolume fitoplanctônico, principalmente na primavera e no verão em decorrência da diferença na luminosidade e temperatura, parâmetros físicos importantes para o desenvolvimento de cianobactérias na natureza (Bormans *et al.*, 2005; Flynn, 2001). Outro fator determinante no desenvolvimento de cianobactérias, como *Synechococcus*, é a facilidade na assimilação de nitrogênio do ambiente em temperaturas elevadas (encontradas nas estações da primavera e verão) (Sakamoto & Bryant, 1999) e excelente oxigenação (Fay, 1992). Como nitrogênio é limitante no crescimento observamos uma temperatura ótima de atividade em 40°C, propiciando uma vantagem adaptativa desta microalga e sua dominância nestas estações do ano.

Em cianobactérias, o sistema fotossintético é conectado fortemente com outras vias metabólicas importantes, sendo a fluorescência da clorofila importante para sinalizar rapidamente informações fotossintéticas e condições de aclimação destas microalgas (Campbell *et al.*, 1998). A utilização de oxifluorfenol não interferiu na confecção da curva de crescimento via fluorescência, uma vez que este herbicida fluoresce em comprimentos de ondas ( $\lambda$  exc. = 288 nm,  $\lambda$  em. = 300 nm) (Scrano *et al.*, 2002) diferentes daqueles da clorofila ( $\lambda$  exc. = 460 nm,  $\lambda$  em. = 680 nm).

A sonicação foi o método utilizado para o rompimento da parede celular desta microalga, sendo realizada em gelo, pois, a baixa temperatura diminui o

risco de inativação da NR por proteases (Hurd *et al.*, 1995). A obtenção de extrato bruto contendo a NR ativa em diferentes organismos pode ser realizada por diversas metodologias. Em macroalgas vermelhas marinhas como *G. tenuistipitata*, por exemplo, a sonicação não é efetiva na ruptura celular, sendo a maceração em nitrogênio líquido o método mais adequado (Lopes *et al.*, 1997). Em microalgas a utilização de altas pressões de N<sub>2</sub> (Ramalho *et al.*, 1995), sonicação e maceração em nitrogênio líquido, são as metodologias mais adotadas para a obtenção de extratos celulares (Berges & Harrison, 1995).

A atividade da enzima NR de *M. aeruginosa* apresenta atividade numa faixa de temperatura que vai de 30° a 60°C, tendo como temperatura ótima de ensaio estimada de 40°C, ressaltando uma temperatura ótima de reação acima das descritas para as NR das cianobactérias *Synechocystis*, *Synechococcus* e *Gloeocapsa* (30°C) (Nieto-Martin *et al.*, 1991), de diatomáceas marinhas (24°C) (Berges & Harrison, 1995) e macroalgas marinhas como *Kappaphycus alvarezzi* (20°C) (Granbom *et al.*, 2004). Tal fato demonstra uma adaptação de *M. aeruginosa* ao ambiente tropical e estações do ano de temperaturas elevadas, facilitando seu desenvolvimento, uma vez que a assimilação de nitrogênio (principal nutriente limitante no desenvolvimento) ocorre melhor em temperaturas elevadas (aproximadamente 40°C) (Sakamoto & Bryant, 1999).

A NR de *M. aeruginosa* apresenta maior atividade em pH alcalino, apresentando atividade máxima em pH 10,0. Um pH ótimo de reação alcalino também foi evidenciado em cianobactérias como *Anacystis nidulans*, *Anabaena sp.* e *Nostoc sp.* (Herrero *et al.*, 1981). Isso sugere uma boa adaptabilidade e que

cianobactérias podem desenvolver-se em pH alcalino (pH 11,0), por possuírem sistemas para sobreviver sob severas condições ambientais (Wutipraditkul *et al.*, 2005).

O  $K_M$  aparente encontrado para nitrato foi de 0,6 mM, valor este muito superior quando comparado com NR de *Kappaphycus alvarezii* (30  $\mu$ M) (Granbom *et al.*, 2004) ou de *Cucurbita maxima* (50  $\mu$ M) (Lillo *et al.*, 1997). No entanto, quando comparado com NR de microalgas marinhas como *Skeletonema costatum*, *Aphidinium carterae* e *Thalassiosira pseudonana* (10 mM) (Berges & Harrison, 1995) o  $K_M$  encontrado é inferior, talvez por diferença de ambiente e disponibilidade de nutriente.

Na tabela 2 estão resumidos os valores de  $K_M$  para nitrato para cianobactérias não-fixadoras e fixadoras de nitrogênio ( $N_2$ ). Os baixos valores (indicando uma alta afinidade pelo o substrato), por exemplo, 0,16 mM para *Nostoc sp.* (uma cianobactéria fixadora de  $N_2$ ), evidencia uma melhor adaptação destas ao ambiente, pois a fixação de  $N_2$  somente ocorre em condições anaeróbicas ou até mesmo pelo o acúmulo de amônia intracelular (White, 2000), com isso, em condições aeróbicas a assimilação de nitrato (uma fonte de  $N_2$ ) por *Nostoc sp.* é mais eficiente do que a encontrada em *M. aeruginosa*.

**Tabela 2 – Comparação dos diferentes valores de  $K_M$  para nitrato descritos para NRs de diferentes cianobactérias.**

<b>Espécie</b>	<b>Material</b>	<b><math>K_M</math> (mM)</b>
<b>-Filamentosa, fixadora de N<sub>2</sub></b>		
<i>Anabaena variabilis</i>	TOL.	0,15
<i>Anabaena variabilis</i>	EB	0,25
<i>Calothrix</i> sp PCC 7101	TOL.	0,17
<i>Nostoc</i> sp ATCC 29105	TOL.	0,16
<b>-Unicelular</b>		
<b><i>Microcystis aeruginosa</i></b>	<b>EB</b>	<b>0,60</b>
<i>Synechocystis</i> sp PCC 6803	EB	0,55
<i>Synechococcus</i> sp PCC 6301	TOL.	1,7
<i>Gloeocapsa</i> sp CS502	TOL.	1,3

As condições de cultivos das demais cianobactérias foram semelhantes às condições de cultivo para *M. aeruginosa*. Os ensaios enzimáticos ocorreram em extrato bruto (EB) ou com pré-tratamento de tolueno (TOL.) (Nieto-Martin *et al.*, 1991).

A determinação do  $K_M$  aparente para NADPH e NADH como fonte redutora sugere a utilização de ambos como fonte redutora pela NR desta microalga. Pelos valores de  $K_M$  encontrados para NADPH (1,5 mM) e NADH (1,6 mM) demonstra-se que não há, aparentemente, restrição na utilização de NADPH ou NADH pelas células de *M. aeruginosa*.

Os experimentos de resistência ao oxifluorfeno revelaram a sensibilidade da *M. aeruginosa* (10  $\mu\text{g/L}$ ) a este composto. Em *Scenedesmus obliquus* (Geoffroy *et al.*, 2003) foram utilizados 25  $\mu\text{g/L}$  de oxifluorfeno e mesmo tempo de incubação. Vale ressaltar que os experimentos em *S. obliquus* foram realizados com  $\text{IC}_{50}$ , enquanto os experimentos em *M. aeruginosa* em  $\text{IC}_{20}$ , demonstrando que uma pequena concentração da droga é suficiente para a inibição na síntese de heme-enzimas. A utilização deste herbicida permitiu observar a provável função “alternativa” de NR na geração de  $\bullet\text{NO}$ , uma vez que ocorrendo a inibição na síntese de heme-enzimas via oxifluorfeno, incluindo NiR, o  $\text{NO}_2^-$  acumula-se intracelularmente induzindo a formação de  $\bullet\text{NO}$  via NR. A produção do  $\bullet\text{NO}$  pode ser observada pelos produtos gerados indiretamente (Feelisch *et al.*, 2002). Observa-se também a atuação de oxifluorfeno como inibidor na síntese de heme-enzimas, pela diminuição da atividade de CAT e indução da SOD. Algo que em condições fisiologicamente normais não ocorreria, uma vez que a intensa degradação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  via SOD seria remediada pela a atividade de CAT, transformando  $\text{H}_2\text{O}_2$  (produto de reação da SOD) em  $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  é mediador

de diversos distúrbios em cloroplastos, e também no desenvolvimento celular, porém, os efeitos de  $O_2^{\bullet-}$  poderiam ocasionar danos irreparáveis (Geoffroy *et al.* 2003). Desta forma a diminuição na atividade de CAT sugere uma inibição na síntese de heme-enzimas.

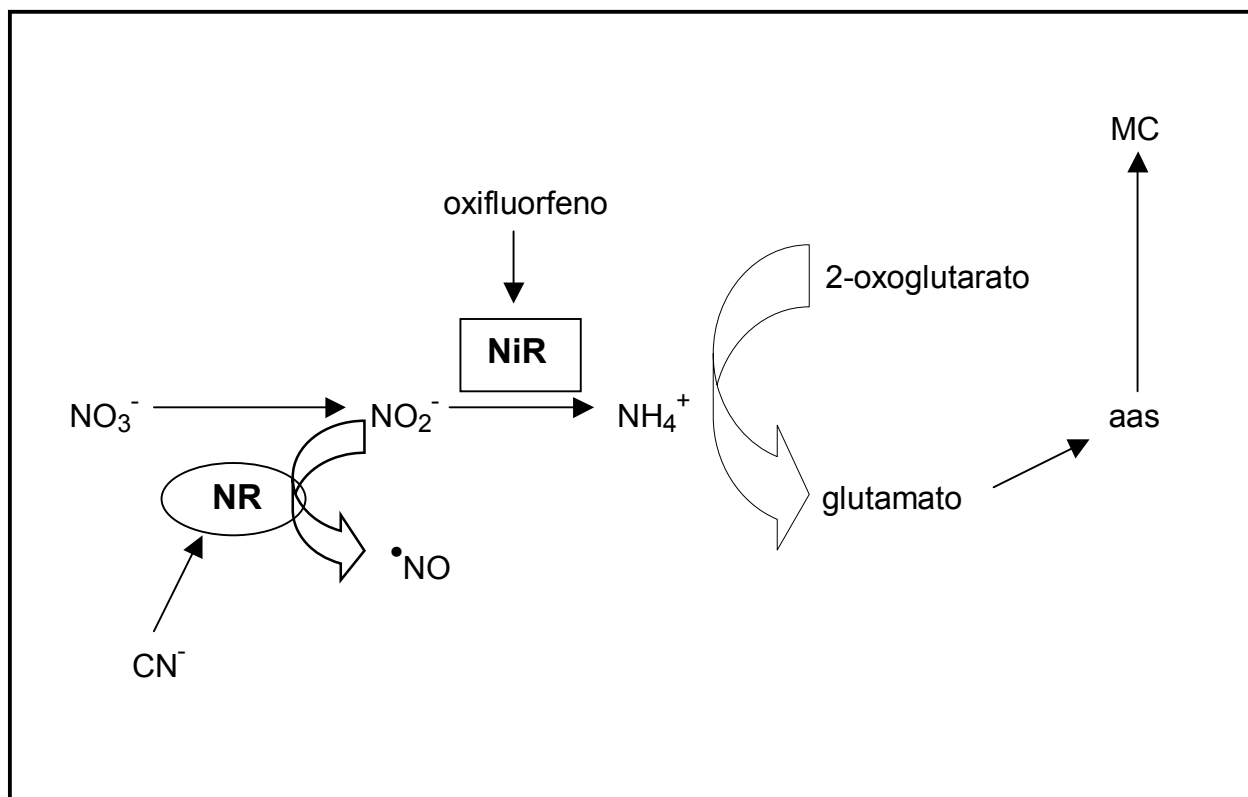
O  $\bullet NO$  é endogenamente produzido por uma forma de enzima denominada NOS, expressa em mamíferos na forma constitutiva e induzida. Em plantas, entretanto, não há um consenso em relação à fonte de  $\bullet NO$ , mas trabalhos indicam a produção de  $\bullet NO$  via NR (Meyer *et al.*, 2005; Wojtaszek, 2000; Desikan *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003) e NOS (Meyer *et al.*, 2005). O  $\bullet NO$  pode participar de muitas respostas fisiológicas, como resposta a patógenos, programação da morte celular, crescimento, germinação e eliminação de etileno (gás envolvido principalmente no amadurecimento de frutos). Em algas e cianobactérias sugere-se que a produção de  $\bullet NO$  ocorra via NR em situação de acúmulo intracelular de  $NO_2^-$  (Mallick *et al.*, 1999; Sakihama *et al.*, 2002).

No esquema 6 sugere-se o aumento intracelular de  $NO_2^-$  em *M. aeruginosa* expostas ao oxifluorfeno e a diminuição deste quando exposto ao cianeto. O acúmulo pode ocorrer pela inibição da NiR através do oxifluorfeno, desta forma a concentração intracelular de  $NO_2^-$  eleva-se e posteriormente é reduzido a  $\bullet NO$  via NR. Com esta via alternativa de redução do  $NO_2^-$ , torna-se comprometida a formação de novas proteínas, pois a formação de  $\bullet NO$  não contribui para a elevação dos níveis de glutamato e, conseqüentemente, origem de novos

aminoácidos (base formadoras de proteínas, como as MC). Porém, ao expor as células de *M. aeruginosa* a cianeto, ocorreu uma diminuição da concentração de  $\text{NO}_2^-$ , desta forma quantificou se concentrações de  $\cdot\text{NO}$  abaixo das células controle (células que não sofreram qualquer tipo de tratamento).

Na literatura discute-se a metabolização de cianeto por procariotos, desta forma a assimilação e metabolização deste composto nestes organismos ocorreria, pois já foi observado em *Bacillus megaterium* a metabolização do cianeto ocorrendo também a condensação (*in vitro*) com serina ou cisteína. Mesmo sendo o cianeto um forte inibidor enzimático e da cadeia de transporte de elétrons, os procariotos podem utilizá-lo na síntese de biomoléculas, como purinas e aminoácidos (Castric & Strobel, 1969). Não se evidencia morte celular de *M. aeruginosa* na utilização de 1,5 mM, concentração inibitória de NR.





**Esquema 6 – Indução no acúmulo de  $\text{NO}_2^-$  via inibição da síntese de heme-enzimas em *M. aeruginosa*.** A inibição da NiR favorece o acúmulo de  $\text{NO}_2^-$ , induzindo a redução deste em  $\text{NO}^\bullet$  via NR, conseqüentemente a formação de novas proteínas torna-se comprometida. Entretanto, a inibição da NR através do cianeto ocasionaria problemas na assimilação de nitrogênio (na forma de nitrato), ocorreria, assim como na inibição da NiR, uma dificuldade do organismo na formação de novas proteínas ( $\text{CN}^-$  - cianeto; aas – aminoácidos; MC - microcistinas).

Em plantas foi demonstrada a produção de  $\bullet\text{NO}$  via NR e o derivado tóxico peroxinitrito, porém sob condições aeróbicas e quando o  $\text{NO}_2^-$  é fornecido como substrato para NR (Yamasaki & Sakihama, 2000).

A formação de nitroso-compostos e de nitrosaminas representam a formação de  $\bullet\text{NO}$ , porém, devido à instabilidade encontrada nesta espécie radicalar, as formas de quantificá-lo ocorrem através dos produtos formados após a ligação do  $\bullet\text{NO}$ . Em algas verdes como *Scenedesmus obliquus* e *Chlamydomonas reinhardtii*, na cianobactéria *Anabaena doliolum* e em *Zea mays* (Yamasaki & Sakihama, 2000) a produção de  $\bullet\text{NO}$  foi detectada e atribuída à atividade de NR (Mallick *et al.*, 1999).

A atividade específica de NR em *M. aeruginosa* encontrada nos tratamentos com oxifluorfeno e oxifluorfeno com a adição de cianeto, sugere a participação da NR na formação de  $\bullet\text{NO}$ . Obviamente estudos neste sentido terão continuidade para que se possa ter melhor entendimento a respeito deste mecanismo.

## 6. CONCLUSÕES PRINCIPAIS

Neste trabalho foi realizada a caracterização bioquímica parcial da NR, que como dito anteriormente, é a primeira enzima envolvida no processo de assimilação de nitrogênio e representa o passo regulatório desta via em *M. aeruginosa*. Neste sentido mostramos que:

- i. A NR é uma enzima que tolera uma ampla faixa de pH e temperatura, com valores ótimos em 10,0 e 40°C, respectivamente;
- ii. Esta enzima é biespecífica para NADH e NADPH como fonte redutora, tendo os valores de  $K_M$  aparente para NADH (1,6 mM) e NADPH (1,5 mM);
- iii. O  $K_M$  encontrado para nitrato é de 0,6 mM;
- iv. A enzima NR pode estar envolvida na função “alternativa” de produção de  $\bullet\text{NO}$ , onde a inibição de NiR por oxifluorfenol aumentou a concentração de  $\text{NO}_2^-$ ;
- v.  $\text{IC}_{20}$  de oxifluorfenol para *M. aeruginosa* é de 10  $\mu\text{g/L}$ ;
- vi. O cianeto inibe gradativamente a atividade de NR atingindo o máximo em 1,5 mM;
- vii. A atividade de CAT é inibida em presença de oxifluorfenol;
- viii. A atividade de SOD é aumentada em presença de oxifluorfenol;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. (1984). Catalase *in Vitro*. *Methods in Enzimology.*, 105: 121-126.

AMY, N.K. & GARRET, R.H. (1974). Purification and characterization of the nitrate reductase from the diatom *Thalassira pseudonana*. *Plant Physiology*, 54: 629-637.

AZCÓN-BIETO, J.; MURILLO, J. & PEÑUELAS, J. (1987). Cyanide-Resistant respiration in photosynthetic organs of freshwater aquatic plants. *Plant Physiology*, 84: 701-706.

BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. (1969). Nitrate reduction in higher plants. *Annual Review Plant Physiology*, 20: 495-519.

BERGES, J.A. & HARRISON, P.J. (1995). Nitrate reductase activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: A revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 40: 82-93.

BERGES, J.A. (1997). Miniview: Algal nitrate reductases. *European Journal of Phycology*, 32: 3-8.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.C. & BOLCH, C.J.S. (2001a). Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *Journal of Phycology* , 37: 810-818.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, M.C. & YUNES, J.S. (2001b). O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética. *Revista Biotecnológica* , 23: 44-47.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. & MOLICA, R. (2003). Cianobactéria invasora – Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindropermopsis raciborskii* no Brasil. *Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento*, 82-90.

BORMANS, M.; FORD, P.W. & FABBRO, L. (2005). Spatial and temporal variability in cyanobacterial populations controlled by physical processes. *Journal of Plankton Research* , 27: 61-70.

BRADFORD, M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

CAMPBELL, D.; HURRY, V.; CLARKE, A.K.; GUSTAFSSON, P. & ÖQUIST, G. (1998). Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 62: 667-683.

CAMPBELL, W.H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review Plant Physiology* , 50: 277-303.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P. & PINTO, E. (2006). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*, (no prelo ).

CARMICHAEL, W.W. (1992). Cyanobacterial secondary metabolites; the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 445-459.

CASTRIC, P & STROBEL, G.A. (1969). Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 4089-4094.

CHAPMAN, D.J. & HARRISON, P.J. (1988). Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity. In: LOBBAN, C.S.; CHAPMAN, D.J. & KREMER, B., eds.: *Experimental Phycology. A Laboratory Manual*. Cambridge Univ. Press. , 196-202.

CODD, G.A. (2000). Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritization of eutrophication control. *Ecological Engineering* , 16: 51-60.

DAWSON, R.M. (1998). The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36: 953-962.

DESIKAN, R.; GRIFFITHS, R.; HANCOCK, J. & NEILL, S. (2002). A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16314-16318.

EVANS, H.J. & NASON, A. (1953). Pyridine nucleotides nitrate reductase from extracts of higher plants. *Plant Physiology*, 28: 233-254.

FALKOWSKI, P.G.; KATZ, M.E.; KNOLL, A.H.; QUIGG, A.; RAVEN, J.A.; SCHOFIELD, O. & TAYLOR, F.J.R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305: 354-360.

FAY, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews*, 340-373.

FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N.S.; JOURD'HEUIL, D. & KELM, M. (2002). Concomitant S-, N-, heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB Journal* 16: 1775-1785.

FERGUSON, A.R. & BOLLARD, E.G. (1969). Nitrogen metabolism of *Spirodela oligorrhiza*. I. Utilization of ammonium, nitrate, and nitrite. *Planta*, 88: 344-352.

FLYNN, K.J. (2001). A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interaction in phytoplankton. *Journal of Plankton Research* , 33: 977-997.

FLOHÉ, L. & ÖTTING, F. (1971). Superoxide Dismutase Assays. *Methods in Enzimology.*, 105: 93-104.

FLORES, E.; FRÍAS, J.E.; RUBIO, L.M. & HERRERO, A. (2005). Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83: 117-133.

FRANCO, A.R., CÁRDENAS, J & FERNÁNDEZ E. (1988). Regulation by ammonium of nitrate and nitrite assimilation in *Chamydomonas reinhardtii*. *Biochemical and Biophysical Acta*, 951: 98-103.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, J.M. & DIEZ, J. (2004). Adaptative mechanisms of nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. *Research in Microbiology*, 155: 795-802.



GEHRINGER, M.M. (2004). Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters*. 557: 1-8.

GEOFFROY, L.; DEWEZ, D.; VERNET, G. & POPOVIC, R. (2003). Oxyfluorfenol Toxic Effect on *S. obliquus* Evaluated by Different Photosynthetic and Enzymatic Biomarkers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 445-452.

GRANBOM, M.; CLOW, F.; LOPES, P.F.; OLIVEIRA, M.C.; COLEPICCOLO, P.; PAULA E.J. & PEDERSEN, M. (2004). Characterisation of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *Aquatic Botany*, 78: 295-305.

GRASSHOFF, K.; ENHARDT, M. & KEMELING, K. (1983). Determination of nitrite. *In: Methods of Sea Water Analysis.*, *Verlag Chemie*, Weinheim, 139-142.

HERRERO, A.; FLORES, E. & GUERRERO, M.G. (1981). Regulation of Nitrate Reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp Strain 7119, and *Nostoc* sp. Strain 6719. *Journal of Bacteriology*, 175-180.

HIRASAWA, M.; RUBIO, L.M.; GRIFFIN, J.L.; FLORES, E.; HERRERO, A.; LI, J.; KIM, SUNG-KUN.; HURLEY, J.K.; TOLLIN, G. & KNAFF, D.B. (2004). Complex formation between ferredoxin and *Synechococcus* ferredoxin:nitrate oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1608: 155-162.

HOEGER, S.J.; HITZFELD, B.C. & DIETRICH, D.R. (2005). Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 231-242.

HUBER, J.L.; HUBER, S.C; CAMPBELL, W.H. & REDINDAUGH, M.G. (1992). Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 259: 58-65.

HURD, C.L.; BERGES, J.A.; OSBORNE, J. & HARRISON, P.J. (1995). An in vitro nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardnari* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, 31: 835-843.

JANG, M.H.; KYONG, A.H.; JOO, G.J. & TAKAMURA, N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, 48: 1540-1550.

KASTLE, J.H. & ELVORE, E. (1904). On the reduction of nitrates by certain plant extracts and metals, and the accelerating effect of certain substances on the process of reduction. *American Chemistry Journal* , 31: 606-639.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. & SENNA, P.A.C. (2002). Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *Microcystis panniformis* sp. nov.. *Cryptogamie Algologie*, 2: 159-177.

LEA, P.J. (1993). Nitrogen metabolism. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. (P.J. Lea & R.C. Leegood) John Wiley & Sons Ltd., 155-179.

LEE, TZONG-HUEI & CHOU, HONG-NONG. (2000). Isolation and identification of seven microcystins from a cultured M.TN-2 strain of *Microcystis aeruginosa*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.*, 41: 197-202.

LILLO, C.; KAZAZAIC, S.; RUOFF, P. & MEYER, C. (1997). Characterization of Nitrate Reductase from Light- and Dark-Exposed Leaves. *Plant Physiology*, 114: 1377-1383.

LOPES, P.F.; OLIVEIRA, M.C. & COLEPICOLO P. (1997). Circadian fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* , 33: 225-231.

MALLICK, N.; RAI, L.C.; MOHN, F.H. & SOEDER, C.J. (1999). Studies on Nitric oxide (NO) formation by the green alga *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Chemosphere*. 39: 1601-1610.

MEYER, C.; LEA, U.S.; PROVAN, F.; KAISER, W.M. & LILLO, C. (2005). Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game?. *Photosynthesis Research*. 83: 181-189.

MIKAMI, B. & IDA, S. (1984). Purification and properties of ferredoxin-nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema borganum*. *Biochemical and Biophysical Acta*, 791: 294-304.

MIYAZAKI, J.; JURICEK, M.; ANGELIS, K.; SCHNORR, K.M.; KLEINHOF, A. & WARNER, R.L. (1991). Characterization and sequence of a novel nitrate reductase from barley. *Molecular Genetics and Genomics*, 228: 329-334.

NASON, A. (1962). Symposium on metabolism of inorganic compounds II. Enzymatic pathways of nitrate, nitrite, and hydroxylamine metabolism. *Bacteriological Review*, 26: 16-41.

NASON, A. (1963). Nitrate reductases. In: *The Enzymes*. (Boyer, Lardy, Myrbach, eds.) Academic Press, 587-607.

NICHOLAS, D.J.D; NASON, A. & McELROY, W.D. (1954). Molybdenum and nitrate reductase. Effects of molybdenum deficiency on the *Neurospora* enzyme. *Journal of Biological Chemistry* , 202: 655-674.

NIETO-MARTIN, J.; FLORES, E. & HERRERO, A. (1991). Biphasic kinetic behavior of nitrate reductase from heterocystous, nitrogen-fixing cyanobacteria. *Plant Physiology*, 100: 157-163.

RAMALHO, C.B.; HASTING, J.W. & COLEPICOLO, P. (1995). Circadian Oscillation of Nitrate Reductase Activity in *Gonyaulax polyedra* is due to Changes in Cellular Protein Levels. *Plant Physiology*, 107: 225-231.

RIGANO, C. & ALIOTTA, G. (1975). Electron donors and inhibitors of nitrate reductases from *Cyanidium caldarium*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 384: 37-45.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M. & STAINER, R. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111: 1-61.

SAKAMOTO, T. & BRYANT, D.A. (1999). Nitrate transport and not photoinhibition limits growth of the freshwater cyanobacterium *Synechococcus* species PCC 6301 at low temperature. *Plant Physiology*, 119: 785-794.

SAKIHAMA, Y.; NAKAMURA, S. & YAMASAKI, H. (2002). Nitric Oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms *Plant Cell Physiology*, 43: 290-297.

SELLNER, K.G.; DOUCETTE, G.J. & KIRKPATRICK, G.J. (2003). Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30: 383-406.

SCRANO, L.; BUFO, S.A.; D'AURIA, M.; MEALLIER, P.; BEHECHTI, A. & SHRAMM, K.W. (2002). Photochemistry and Photoinduced Toxicity of Acifluorfen, a Diphenyl-Ether Herbicide. *Journal of Environmental Quality*, 31: 268-274.

SYRETT, P.J. & MORRIS, I. (1963). The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochemical and Biophysical Acta.*, 65: 566-574.

THOMPSON, P.A.; LEVASSEUR, M.E. & HARRISON, P.J. (1989). Light-limited growth on ammonium vs nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton?. *Limnology and Oceanography*, 34: 1014-1024.

TOIVOLA, D.M. & ERIKSSON, J.E. (1999). Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicology in vitro*. 13: 521-530.

TUTEJA, N.; CHANDRA, M.; TUTEJA, R. & MISRA M.K. (2004). Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 4:227-237.

VELINI, E.D.; TRINDADE, M.L.B.; ALVES, E.; CATÂNEO, A.C.; MARINO, C.L.; MAIA, I.G.; MORI, E.S.; FURTADO, E.L.; GUERRINI, I.A. & WILCKEN, C.F. (2005). Eucalyptus ESTs corresponding to the protoporphyrinogen IX oxidase enzyme related to the synthesis of heme, chlorophyll, and to the action of herbicides. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 548-554.

VOTHKNECHT, U.C. & WESTHOFF, P. (2001). Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1541: 91-101.

YAMAMOTO, A.; KATOU, S.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N. & KAWAKITA, K. (2003). Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *Journal of General Plant Pathology* , 69: 218-229.

YAMAMOTO-KATOU, A.; KATOU, S.; YOSHIOKSA, H.; DOKE, N. & KAWAKITA, K. (2006). Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiology*, 47: 726-735.

YAMASAKI, H. & SAKIHAMA, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vivo evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* , 468: 89-92.

WOJTASZEK, P. (2000). Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry*, 54: 1-4.

WHITE, D. (2000). Nitrogen Fixation. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. 2ª edição, Ed. (), Oxford, 319-323.

WHITE, S.H.; FABBRO, L.D. & DUIVENVOORDEN, L.J. (2003). Changes in Cyanoprokaryote Populations *Microcystis* Morphology, and Microcystin Concentration in Lake Elphinstone (Central Queensland, Australia). *Environmental Toxicology*, 18: 403-412.

WUTIPRADITKUL, N.; WADITEE R.; INCHAROENSAKDI, A.; HIBINO, T.; YANAKA, Y.; NAKAMURA, T.; SHIKATA, M.; TAKABE, T. & TAKABE T. (2005). Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Contains NapA-Type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters with Novel Ion Specificity That Are Involved in Salt Tolerance at Alkaline pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 4176-4184.



## 9. CURRICULUM VITAE

### DADOS GERAIS

#### - *Identificação*

Nome completo: Anderson de Oliveira Souza

Nome em citações bibliográficas: SOUZA, A.O.

#### - *Formação Acadêmica/ Titulação*

Nível: Ensino médio – curso não profissionalizante

Instituição: Lyceu de Goiânia

Nível: Graduação (1998 - 2002)

Instituição: Centro Universitário de Rio Preto

Curso: Biologia

Bolsa: Estágio remunerado (08/2000 – 12/2002)

#### - *Produção bibliográfica*

Trabalhos em eventos – **Production of nitric oxide from the inhibition of heme-enzymes with Oxyfluorfen in *Microcystis aeruginosa***, apresentado no IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, no período 29 de junho a 2 de julho de 2005.

Artigo publicado (2006) – **Metabolites from algae with economical impact** (no prelo) - Comparative Biochemistry and Physiology.

### DADOS COMPLEMENTARES

#### - *Orientações em andamento.*

- Kleber Oliveira Santos & Ana Luiza Santana Hage - **Disfunções decorrentes do período gestacional com possibilidades terapêuticas da fisioterapia dermato-funcional.** Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Fisioterapia da Universidade Gama Filho, Salvador – BA.