

Amanda Wanderley

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

São Paulo

2009

Amanda Wanderley

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

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências, na
área de Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho

São Paulo

2009

Wanderley, Amanda

Influência da disponibilidade de nitrato sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). vi + 140 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Gracilariopsis tenuifrons*. 2. Nitrato. 3. Nitrato redutase. 4. Crescimento. 5. Composição química. 6. Pigmentos. 7. Polissacarídeos.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Profª. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho
Orientadora

Aos meus queridos pais, Solange e Mozaniel. Obrigada por todo amor e dedicação.

Ando devagar porque já tive pressa
Levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Eu nada sei

....

Sinto que seguir a vida seja simplesmente
Conhecer a marcha e ir tocando em frente
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz

Tocando em frente – Almir Sater e Renato Teixeira

Não está na natureza das coisas que o homem realize um descobrimento súbito e inesperado. A ciência avança passo a passo e cada homem depende do trabalho de seu predecessor.

Ernest Rutherford

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais Solange e Mozaniel pelo amor e atenção a mim dedicados, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos e por possibilitarem que eu tivesse a melhor educação possível.

Aos meus irmãos Vinícius e Victor, a vida não teria a mesma graça sem vocês.

À minha tia Sirlene, à minha avó Santina e ao meu avô Germano que, apesar de não entenderem muito bem meu trabalho, sempre me apoiaram.

À tia Lucinda, grande amiga da minha família, por todos os cuidados comigo.

Ao meu cãozinho Choquito, por todo seu amor e devoção a mim, em qualquer momento, e por fazer minha vida mais feliz.

Ao Jonny, por todo seu carinho, dedicação e compreensão, pela companhia no LAM em vários finais de semana e na estadia em Curitiba, por resolver meus problemas técnicos com o computador, enfim, por fazer parte da minha vida.

À minha orientadora Dra. Fungyi Chow, por ter me aceitado como sua primeira aluna e pela amizade e ensinamentos desde a minha iniciação científica.

Ao Rosário, por ajudar a colocar em prática todas as nossas maluquices, pelos momentos descontraídos e por toda ajuda ao longo desses mais de cinco anos. O LAM não seria nada sem você!

Aos LAMigos com os quais convivi, que tornaram a rotina de laboratório muito mais agradável e os horários de almoço e lanchinho momentos divertidíssimos: Aninha, Bia, Cíntia Schultz, Cristalina, Danica (que saudade!), Dani Milstein, Daniel (Fernando) Diógina, Guigui, Guizinho, Henrique, José, Lagosta, Leila, Letícia, Lígia, Lucis, Marcella, Maria Helena, Mari, Monica, Nat, Nelso, Rose, Suzana e Valéria.

Agradecimentos especiais à Monica e à Rose, que me ensinaram os primeiros passos no LAM. À Lucis, pela amizade verdadeira, por todo apoio e por ter me levado para o bom caminho da dança do ventre. À Leila, pela leitura crítica da introdução deste trabalho. Ao Carlos Hotta, pela correção do *abstract*. E agradecimentos mais do que especiais ao José, o Jojo, pela amizade, ajudas diversas, leitura crítica deste trabalho, discussões ficológicas, momentos de descontração e conversas via Skype.

Aos professores do LAM, Estela, Eurico, Flávio e Mariana, por compartilharem conosco todo seu conhecimento e, assim, contribuírem para a minha formação profissional.

Às professoras Déborah, Eny, Helenice e Maria Luiza do Departamento de Botânica, por permitirem que eu usasse equipamentos em seus laboratórios.

Às minhas amigas de departamento e companheiras de congressos Alessandra, Amanda, Camila, Cássia e Júlia, pelos ótimos momentos e por contribuírem para o meu aprendizado científico.

Às técnicas Ana Maria e Carmem, pela solicitude em ajudar sempre que necessário.

À Profa. Dra. Elisabete de Santis Braga e ao técnico Vitor Gonzalez Chiozzini do Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços do Mar do Instituto Oceanográfico da USP, pelas análises de nutrientes dissolvidos na água no mar.

Ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e à Profa. Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte, por me receberem no Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, e à Luciana Garcia Ferreira pela ajuda na preparação das amostras para análise de ressonância magnética nuclear.

Ao IB e à USP, pela infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida, e à CAPES, pelo apoio financeiro em congressos e na estadia em Curitiba. À Fapesp, pelo financiamento da linha de pesquisa da minha orientadora, em que está inserido o meu trabalho.

Muito obrigada a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho!

Índice

Lista de Abreviaturas.....	3
Lista de Figuras.....	4
Lista de Tabelas.....	9
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	12
1.1. Importância econômica das algas gracilarióides.....	13
1.2. <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	14
1.3. O nitrogênio no ambiente marinho.....	15
1.4. Metabolismo do nitrato.....	16
1.5. Nitrato redutase.....	19
1.6. Efeito do nitrogênio sobre a composição química de macroalgas.....	22
2. Objetivo.....	25
3. Material e Métodos.....	27
3.1. Procedência do material biológico.....	28
3.2. Condições gerais do cultivo estoque de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	28
3.3. Delineamento experimental: influência da disponibilidade de nitrato no meio de cultivo sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	29
3.4. Parâmetros analisados.....	33
3.5. Análise estatística.....	40
4. Resultados e Discussão.....	41
4.1. Crescimento, conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio e atividade <i>in vitro</i> da NR.....	42
4.2. Atividade da NR frente ao aumento de irradiância ou ao suprimento de uma fonte de carbono.....	55
4.3. Taxa de captação e porcentagem de remoção de nitrato e fosfato e reservas intracelulares de nitrogênio.....	63
4.4. Rendimento e qualidade dos polissacarídeos.....	75
5. Considerações Finais.....	93
6. Referências Bibliográficas.....	97

Apêndice I: Otimização do ensaio <i>in vitro</i> da nitrato redutase em <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>.....	112
Apêndice II: Padronização da extração e da quantificação de ficobiliproteínas e clorofila <i>a</i> em <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>.....	120

Lista de Abreviaturas

3,6-AG = 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose
ADP = adenosina difosfato
AT = aminotransferases
ATP = adenosina trifosfato
BSA = albumina bovina sérica
cit *b* = citocromo *b*
C:N = razão entre carbono e nitrogênio teciduais
CNH = carbono, nitrogênio e hidrogênio teciduais
DMF = N,N-dimetilformamida
DMSO = dimetilsulfóxido
DTT = ditioneitol
EDTA = ácido etilenodiamina tetra-acético
FAD = flavina adenina dinucleotídeo
Fd-ox = ferredoxina oxidada
Fd-red = ferredoxina reduzida
GDH = glutamato desidrogenase
GOGAT = 2-oxoglutarato aminotransferase
GS = glutamina sintetase
K_m = constante de Michaelis-Menten
MF = massa fresca
mRNA = RNA (ácido ribonucléico) mensageiro
MS = massa seca
NAD⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NED = *n*-(1-naftil)-etilenodiamina diidrocloro
NiR = nitrito redutase
NR = nitrato redutase
Pi = fosfato inorgânico
PK = proteína quinase
PP2A = proteína fosfatase tipo 2A
PS = proteína solúvel total
p/v = peso/volume
RMN-¹³C = ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN-¹H = ressonância magnética nuclear de prótons
TC = taxa de crescimento
TCA = ácido tricloroacético
VS = solução de enriquecimento de von Stosch
VS-N = solução de enriquecimento de von Stosch sem nitrato
v/v = volume/volume

Lista de Figuras

Figura 1.1.	Estrutura química básica do ágar (modificado de Lahaye, 2001).....	14
Figura 1.2.	Esquema da assimilação de nitrato. NR = nitrato redutase; NiR = nitrito redutase; GS = glutamina sintetase; GOGAT = glutamina:2-oxoglutarato aminotransferase; AT = aminotransferase.....	18
Figura 1.3.	Modelo estrutural da nitrato redutase (NR). C = seqüência C-terminal; Ser-P = serina fosforilada; N = seqüência N-terminal (modificado de Campbell, 2001).....	20
Figura 1.4.	Modelo da regulação pós-traducional da nitrato redutase (NR) por fosforilação e desfosforilação, envolvendo as enzimas proteína quinase (PK) e proteína fosfatase do tipo 2A (PP2A) e a ligação de proteínas inibitórias da família 14-3-3 (modificado de Buchanan <i>et al.</i> , 2000).....	21
Figura 3.1.	Aspecto geral dos gametófitos femininos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> utilizados neste estudo.....	28
Figura 3.2.	Sistema de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> em câmara com condições abióticas controladas.....	31
Figura 3.3.	Processo de liofilização dos polissacarídeos extraídos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	38
Figura 3.4.	Espectrômetro Bruker, modelo DRX 400, série AVANCE, usado para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³ C e ¹ H dos polissacarídeos extraídos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	40
Figura 4.1.	Aspecto dos ápices de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> após 28 dias de cultivo em diferentes condições de nitrato, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. I = Água do mar, II = VS-N 50%, III = VS-N 50% + 50 µM NO ₃ ⁻ , IV = VS-N 50% + 150 µM NO ₃ ⁻ , V = VS-N 50% + 250 µM NO ₃ ⁻ , VI = VS-N 50% + 500 µM NO ₃ ⁻ e VII = VS-N 50% + 750 µM NO ₃ ⁻	42
Figura 4.2.	Taxa de crescimento (%MF.d ⁻¹) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	43
Figura 4.3.	Massa seca (%) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	45
Figura 4.4.	Conteúdo tecidual de (a) carbono, (b) hidrogênio e (c) nitrogênio (mg.gMS ⁻¹) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	46
Figura 4.5.	Razão C:N de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	47
Figura 4.6.	Correlação entre razão C:N e taxa de crescimento de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).....	48

- Figura 4.7.** (a) Atividade *in vitro* da NR (10^{-3} U.gMF⁻¹) e (b) atividade específica da NR (10^{-3} U.mgPS⁻¹) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05)..... 51
- Figura 4.8.** Concentração de proteína solúvel total ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05)..... 52
- Figura 4.9.** Atividade *in vitro* da NR (U.gMF⁻¹) de *Gracilariopsis tenuifrons*, cultivada em VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, submetida a três tratamentos: i) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) 500 ± 10 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ + 0,3 M glicerol, por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança..... 56
- Figura 4.10.** Atividade específica da NR (U.mgPS⁻¹) de *Gracilariopsis tenuifrons*, cultivada em VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, submetida a três tratamentos: i) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) 500 ± 10 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ + 0,3 M glicerol, por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança..... 58
- Figura 4.11.** Concentração de proteína solúvel total ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*, cultivada em VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, submetida a três tratamentos: i) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) 500 ± 10 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ + 0,3 M glicerol, por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança..... 59
- Figura 4.12.** Nitrato removido (%) do meio de cultivo, após 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min, por *Gracilariopsis tenuifrons* submetida a três tratamentos i) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) 500 ± 10 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) 65 ± 5 $\mu\text{mol de f\^otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ + 0,3 M glicerol (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança..... 59
- Figura 4.13.** Taxa de captação de nitrato ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}.\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em: (a) VS-N 50%, (b) VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$, (c) VS-N 50% + 150 $\mu\text{M NO}_3^-$ e (d) VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$, durante 4 semanas, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de nitrato em cada semana, para cada tratamento..... 64
- Figura 4.14.** Taxa de captação de nitrato ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}.\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo: i) média das taxas de captação das quatro semanas experimentais e ii) taxa de captação após 24 h da última renovação do meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de nitrato das quatro semanas experimentais e a porcentagem de remoção após 24 h da última renovação do meio de cultivo, para cada tratamento..... 65
- Figura 4.15.** Taxa de captação de fosfato inorgânico ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}.\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em: (a) VS-N 50%, (b) VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$, (c) VS-N 50% + 150 $\mu\text{M NO}_3^-$ e (d) VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$, durante 4 semanas, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de fosfato em cada semana, para cada tratamento..... 68
- Figura 4.16.** Taxa de captação de fosfato inorgânico ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}.\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa

	fresca por 1 L de meio de cultivo: i) média das taxas de captação das quatro semanas experimentais e ii) taxa de captação após 24 h da última renovação do meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de fosfato das quatro semanas experimentais e a porcentagem de remoção após 24 h da última renovação do meio de cultivo, para cada tratamento.....	69
Figura 4.17.	Concentração de (a) ficoeritrina e (b) ficocianina ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) e (c) razão entre ficoeritrina e ficocianina de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	71
Figura 4.18.	Concentração de clorofila a ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	73
Figura 4.19.	(a) Concentração de proteína solúvel total ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) e (b) razão entre concentração de ficobiliproteínas (ficoeritrina e ficocianina) e proteínas solúveis de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	74
Figura 4.20.	Taxa de crescimento ($\%\text{MF.d}^{-1}$) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	76
Figura 4.21.	Massa seca (%) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	77
Figura 4.22.	Conteúdo tecidual de (a) carbono, (b) hidrogênio e (c) nitrogênio (mg.gMS^{-1}) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	79
Figura 4.23.	Razão C:N de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	80
Figura 4.24.	Rendimento dos polissacarídeos (%) extraídos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	82
Figura 4.25.	Correlação entre conteúdo de nitrogênio tecidual e rendimento dos polissacarídeos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).....	83
Figura 4.26.	Correlação entre razão C:N e rendimento dos polissacarídeos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).....	83

Figura 4.27.	Conteúdo de carboidrato total (%) do polissacarídeo de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	84
Figura 4.28.	Conteúdo de sulfato (%) do polissacarídeo de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	84
Figura 4.29.	Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³ C dos polissacarídeos extraídos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> mantida nas condições do cultivo estoque.....	87
Figura 4.30.	Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹ H dos polissacarídeos extraídos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo.....	88
Figura 4.31.	Razão amido:(3,6-AG + precursor) do polissacarídeo de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	89
Figura 4.32.	Correlação entre nitrogênio tecidual e razão amido:(3,6-AG + precursor) dos polissacarídeos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).....	89
Figura 4.33.	Correlação entre razão C:N e razão amido:(3,6-AG + precursor) dos polissacarídeos de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).....	90
Figura 1.	(a) Atividade <i>in vitro</i> da NR (10 ⁻³ U.gMF ⁻¹) e (b) atividade específica da NR (10 ⁻³ U.mgPS ⁻¹) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> frente a diferentes concentrações de NADH no tampão de reação. Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	115
Figura 2.	(a) Atividade <i>in vitro</i> da NR (10 ⁻³ U.gMF ⁻¹) e (b) atividade específica da NR (10 ⁻³ U.mgPS ⁻¹) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> frente a diferentes temperaturas de incubação. Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	116
Figura 3.	(a) Atividade <i>in vitro</i> da NR (10 ⁻³ U.gMF ⁻¹) e (b) atividade específica da NR (10 ⁻³ U.mgPS ⁻¹) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> em ápices de diferentes comprimentos. Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	116
Figura 4.	Concentração de ficobiliproteínas (µg.gMF ⁻¹) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> . FE = ficoeritrina, FC = ficocianina e AFC = aloficocianina. I = extração no escuro e fórmula de Kursar <i>et al.</i> (1983), II = extração no escuro e fórmula de Beer & Eshel (1985), III = extração em penumbra e fórmula de Kursar <i>et al.</i> (1983) e IV = extração em penumbra e fórmula de Beer & Eshel (1985). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	130
Figura 5.	Concentração de clorofila <i>a</i> (µg.gMF ⁻¹) de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> . I = extração no escuro e II = extração em penumbra, fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).....	130

- Figura 6.** Concentração de ficobiliproteínas ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. FE = ficoeritrina, FC = ficocianina e AFC = aloficocianina. I = extração em tampão fosfato pH 5,5 e fórmula de Kursar *et al.* (1983), II = extração em tampão fosfato pH 5,5 e fórmula de Beer & Eshel (1985), III = extração em tampão fosfato pH 8,0 e fórmula de Kursar *et al.* (1983) e IV = extração em tampão fosfato pH 8,0 e fórmula de Beer & Eshel (1985). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 131
- Figura 7.** Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. I = extração de ficobiliproteínas em tampão fosfato pH 5,5 e II = extração de ficobiliproteínas em tampão fosfato pH 8,0, fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 132
- Figura 8.** Concentração de ficobiliproteínas ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. FE = ficoeritrina, FC = ficocianina e AFC = aloficocianina. I = extração a partir de 300 mg de massa fresca e fórmula de Kursar *et al.* (1983), II = extração a partir de 300 mg de massa fresca e fórmula de Beer & Eshel (1985), III = extração a partir de 120 mg de massa fresca e fórmula de Kursar *et al.* (1983) e IV = extração a partir de 120 mg de massa fresca e fórmula de Beer & Eshel (1985). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 133
- Figura 9.** Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. I = extração a partir de 300 mg de massa fresca e II = extração a partir de 120 mg de massa fresca, fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 133
- Figura 10.** Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*, extraída com diferentes solventes orgânicos e utilizando-se diferentes equações (Tabela V). I = extração em acetona 90% e fórmula de Jeffrey & Humphrey (1975), II = extração em acetona 80% e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), III = extração em acetona 80% e fórmula de Wellburn (1994), IV = extração em acetona 80% tamponada e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), V = extração em DMF e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), VI = extração em DMF e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), VII = extração em DMF e fórmula de Wellburn (1994), VIII = extração em DMSO e fórmula de Wellburn (1994), IX = extração em metanol e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002) e X = extração em metanol e fórmula de Wellburn (1994). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 135
- Figura 11.** Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*, extraída com DMF e utilizando-se diferentes equações (Tabela V). I = trituração e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), II = trituração e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), III = trituração e fórmula de Wellburn (1994), IV = algas intactas mantidas no solvente por 3 h e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), V = algas intactas mantidas no solvente por 3 h e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), VI = algas intactas mantidas no solvente por 3 h e fórmula de Wellburn (1994), VII = trituração + extrato mantido no solvente por 3 h e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), VIII = trituração + extrato mantido no solvente por 3 h e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), IX = trituração + extrato mantido no solvente por 3 h e fórmula de Wellburn (1994). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$)..... 136

Lista de Tabelas

Tabela 3.1.	Soluções estoque para a preparação de solução de enriquecimento de von Stosch (VS; Edwards, 1970). Meio de cultivo enriquecido com VS 50% corresponde a 4 mL da solução de enriquecimento em água do mar, totalizando 1 L de meio.....	29
Tabela 3.2.	Descrição dos tratamentos com as diferentes concentrações de nitrato estudadas.....	30
Tabela 3.3.	Descrição dos tratamentos com as concentrações de nitrato selecionadas.....	32
Tabela 4.1.	Rendimento (%) de polissacarídeos de diferentes espécies de Gracilariaceae.....	85
Tabela I.	Concentração de NADH e temperatura de incubação ótimas e comprimento dos ápices usados no ensaio enzimático <i>in vitro</i> da NR de espécies de Gracilariaceae.....	113
Tabela II.	Fase do histórico de vida, procedência e condições de cultivo de <i>Gracilariopsis tenuifrons</i> usadas em Rossa (1999) e no presente trabalho. VS = von Stosch.....	114
Tabela III.	Máxima atividade <i>in vitro</i> da NR e concentração de nitrato empregada no meio de cultivo de diferentes espécies de Gracilariaceae.....	117
Tabela IV.	Fórmulas para quantificação de clorofila <i>a</i> , derivadas para organismos que possuem clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , de acordo com o solvente orgânico: acetona 90%, acetona 80%, acetona 80% tamponada, DMF, DMSO ou metanol, onde $Cl\ a =$ clorofila <i>a</i> e $A_x =$ absorvância no comprimento de onda x	124
Tabela V.	Fórmulas modificadas para quantificação de clorofila <i>a</i> extraída em acetona 90%, acetona 80%, acetona 80% tamponada, DMF, DMSO ou metanol, em rodófitas, onde $\alpha =$ coeficiente de extinção específico ($L.g^{-1}.cm^{-1}$), $Cl\ a =$ clorofila <i>a</i> e $A_x =$ absorvância no comprimento de onda x .	129

Resumo

O presente trabalho avaliou crescimento, atividade da nitrato redutase (NR), composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em laboratório em meio com adição de 0, 50, 150, 250, 500 ou 750 μM de nitrato. Em algas cultivadas na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, a taxa de crescimento aumentou de acordo com a disponibilidade de nitrato, atingindo um patamar na concentração de 150 μM . Isto indicaria limitação de outro nutriente ou luz ao crescimento da espécie. O conteúdo tecidual de nitrogênio aumentou conforme o incremento de nitrato, devido ao acúmulo de pigmentos fotossintetizantes (ficobiliproteínas e clorofila *a*) e proteínas solúveis. O conteúdo tecidual de carbono e a razão C:N diminuíram com a maior disponibilidade de nitrato no meio de cultivo, provavelmente em resposta à assimilação deste nutriente, que estimularia o fluxo de carbono através das rotas glicolíticas e respiratórias, evitando seu acúmulo como amido das florídeas ou floridosídeo. A atividade da NR foi maior nas algas mantidas em meio com 50 μM de nitrato. Nos tratamentos sem nitrato ou com acréscimo de 250, 500 ou 750 μM de nitrato, os valores de atividade da NR foram baixos e semelhantes entre si. Estes resultados não foram condizentes com os dados de crescimento e nitrogênio tecidual, os quais refletiriam o metabolismo de nitrogênio. Foi sugerida a hipótese de que o acúmulo de compostos nitrogenados pelas algas submetidas aos tratamentos com maior disponibilidade de nitrato poderia desencadear um mecanismo de *feedback* negativo sobre a atividade da NR, inativando-a temporariamente e fazendo com que as algas apresentassem uma baixa atividade enzimática. Submetendo-se as algas cultivadas em meio com adição de 250 μM de nitrato a uma elevada irradiância, foi observado aumento da atividade da NR após 10 min, corroborando a hipótese sugerida. A taxa de captação de nitrato aumentou de acordo com a disponibilidade deste nutriente no meio, sendo que a taxa de captação de fosfato não estava correlacionada à de nitrato. Quando as algas foram cultivadas na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, o conteúdo de nitrogênio foi maior naquelas mantidas em meio com adição de 50 μM de nitrato. Foi observada correlação negativa entre conteúdo tecidual de nitrogênio e razão amido:(3,6-anidro- α -L-galactopiranosose + α -L-galactopiranosose-6-sulfato). Uma vez que não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação ao rendimento de polissacarídeos, aqueles com adição de 50 ou 150 μM de nitrato seriam mais interessantes para a produção de ágar em *Gp. tenuifrons*, nas condições de experimentação empregadas neste trabalho.

Abstract

This study evaluated growth, nitrate reductase (NR) activity, chemical composition and nitrate and phosphate uptake in *Gracilariopsis tenuifrons* grown *in vitro* in medium with addition of 0, 50, 150, 250, 500 or 750 μM of nitrate. In algae maintained at 1 g of fresh weight per litre of culture medium, growth rate increased according to the availability of nitrate, reaching a plateau at the concentration of 150 μM . This indicates limitation of other nutrient or light to the growth of the species. Tissue nitrogen content increased with the increment of nitrate, due to accumulation of photosynthetic pigments (phycobiliproteins and chlorophyll *a*) and soluble proteins. Tissue carbon content and C:N ratio reduced with higher availability of nitrate in the culture medium, probably in response to the assimilation of this nutrient, which stimulates the carbon flux through the glycolytic and respiratory pathways, avoiding its accumulation as floridean starch or floridoside. NR activity was higher in algae kept in medium with 50 μM of nitrate. In treatments without nitrate or with 250, 500 or 750 μM of nitrate, NR activities were low and similar to each other. These results were not consistent with the observed growth rate and nitrogen content, which reflect the nitrogen metabolism. It was suggested that the accumulation of nitrogenous compounds by the algae grown under a higher availability of nitrate could trigger a negative feedback on NR activity, inactivating it temporally, resulting in a low enzymatic activity. When algae grown in medium with 250 μM of nitrate were submitted to a higher irradiance, NR activity increased after 10 min, supporting the suggested hypothesis. Nitrate uptake rate increased according to the availability of this nutrient in the medium, and phosphate uptake rate was not correlated with it. When algae were grown at of 10 g of fresh weight per litre of culture medium, nitrogen content was higher in the algae kept in the medium with 50 μM of nitrate. A negative correlation between nitrogen content and starch:(3,6-anhydro- α -L-galactopyranose + α -L-galactopyranose-6-sulfate) ratio was observed. As there was no significant difference between the treatments in relation to polysaccharides yield, the ones with 50 or 150 μM of nitrate would be more interesting to the production of agar in *Gp. tenuifrons*, in the experimental conditions employed in this study.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Importância econômica das algas gracilarióides

O termo “algas gracilarióides” tem sido empregado para designar espécies de Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) pertencentes aos gêneros *Gracilaria*, *Gracilariopsis* e *Hydropuntia*, este último ainda bastante controverso (Oliveira & Plastino, 1994; Bellorin *et al.*, 2002; 2008).

Tais gêneros têm ampla distribuição em águas tropicais e agregam um alto valor econômico por serem produtoras de ágar (Oliveira & Plastino, 1994; McHugh, 2003). Este ficocolóide tem grande aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica devido a suas propriedades geleificantes, estabilizantes e emulsificantes (Critchley, 1993; Renn, 1997; Oliveira *et al.*, 2000; McHugh, 2003). Calcula-se que anualmente cerca de 145000 t de massa seca de algas gracilarióides sejam processadas para a obtenção de ágar, sendo responsáveis por 85% da produção mundial desse ficocolóide (Oliveira *et al.*, 2000).

O ágar consiste em cadeias lineares alternando unidades de (1→3) β-D-galactopiranosose e (1→4) 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose (3,6-AG; Figura 1.1), sendo que esta última unidade pode estar presente na forma de α-L-galactopiranosose-6-sulfato, seu precursor bioquímico (Mollet *et al.*, 1998; Falshaw *et al.*, 1999; Lahaye, 2001). Apesar da estrutura básica repetitiva, o ágar apresenta grande diversidade estrutural devido aos diferentes substituintes na cadeia principal, como grupos metil, éster sulfato ou acetal de ácido pirúvico (Lahaye & Rochas, 1991). Estas substituições variam de acordo com a espécie da alga, fatores ambientais, aspectos fisiológicos e método de extração (Lahaye & Yaphe, 1989; Chirapart & Onho, 1993; Freile-Pelegrín & Robledo, 1997) e afetam as propriedades físicas e químicas do ágar (Lahaye & Rochas, 1991), as quais determinam seu valor comercial (Marinho-Soriano & Bourret, 2005). A análise química do ágar, com relação aos monossacarídeos e grupos substituintes que o compõem, é utilizada para avaliar indiretamente a qualidade do ágar (Matulewicz, 1996). Considera-se que um elevado conteúdo de 3,6-AG caracteriza géis fortes, enquanto alto teor de sulfato está relacionado a géis fracos (Armisen, 1995; Mollet *et al.*, 1998; Meena, 2008; Orduña-Rojas *et al.*, 2008).

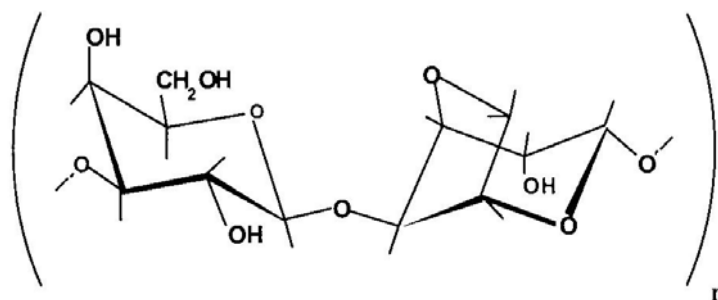


Figura 1.1. Estrutura química básica do ágar (modificado de Lahaye, 2001).

As algas gracilarióides também incluem espécies utilizadas na alimentação humana e na nutrição de invertebrados cultivados (Critchley, 1993; McHugh, 2003) e que possuem grande potencial como biorremediadoras em cultivos integrados pela sua capacidade de remoção de compostos nitrogenados e fosfatados e de manutenção do teor de oxigênio dissolvido (Hernández *et al.*, 2005, 2006; Xu *et al.*, 2008).

1.2. *Gracilariopsis tenuifrons*

Atualmente, *Gracilariopsis* (Dawson) Fredericq *et* Hommersand compreende 12 espécies descritas, sendo que quase todas possuem talo cilíndrico, com ramificações esparsas ou profusas, podem medir até 100 cm de comprimento e têm diâmetro variando de 0,5 a 3 cm (Gurgel *et al.*, 2003; Bellorin *et al.*, 2008). A única exceção é *Gracilariopsis silvana*, encontrada no leste do Caribe, que possui talo achatado (Gurgel *et al.*, 2003; Bellorin *et al.*, 2008).

Gracilariopsis possui histórico de vida trifásico, do tipo “Polysiphonia”, apresentando as fases gametofítica (n), carposporofítica (2n) e tetrasporofítica (2n), sendo que o gametófito e o tetrasporófito são isomórficos e independentes, enquanto que o carposporófito é dependente do gametófito feminino (Critchley, 1993).

Gracilariopsis tenuifrons (Bird *et* Oliveira) Fredericq *et* Hommersand é uma das poucas espécies do gênero que ocorrem na costa oeste do oceano Atlântico, sendo a única representante no litoral brasileiro (Bird & Oliveira, 1986; Gurgel *et al.*, 2003; Bellorin *et al.*, 2008). No Brasil, a espécie é referida desde o Estado de Alagoas até São Paulo (Bird & Oliveira, 1986; Plastino, 1991). Ocorre na região costeira marinha, em ambientes estuarinos e em lagoas salinas, indicando grande tolerância a variações de salinidade (Plastino *et al.*, 1998).

No Brasil, embora a exploração de macroalgas tenha se iniciado por volta de 1940, o impacto social e econômico que esta atividade gera ainda é reduzido e restringe-se

basicamente à região nordeste do país (Oliveira, 1998), sendo que a produção nacional movimenta menos de US\$ 2 milhões (Oliveira & Miranda, 1998), um valor inconspícuo comparado aos US\$ 585 milhões gerados pelo mercado mundial de ficocolóides (McHugh, 2003). *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria cornea* e *Gracilaria caudata* são as principais espécies coletadas na costa nordeste do Brasil por famílias de pescadores, totalizando cerca de 600 t de massa seca de alga para a produção de ágar (Oliveira, 1998; Oliveira & Miranda, 1998; Oliveira *et al.*, 2000; Plastino & Oliveira, 2002).

Por sua ocorrência em águas brasileiras, altas taxas de crescimento (Plastino *et al.*, 1998) e potencial para a produção de ágar (Matsubara, 1997; Oliveira *et al.*, 2000; Zecchin *et al.*, 2000), existe um grande interesse na melhor compreensão dos aspectos fisiológicos e bioquímicos de *Gp. tenuifrons*, principalmente em relação aos mecanismos de crescimento, nutrição e composição química. Para esta espécie, características morfo-anatômicas, com ênfase nas estruturas reprodutoras (Plastino, 1991), efeito de fatores abióticos sobre seu crescimento em laboratório (ex. salinidade e temperatura; Plastino *et al.*, 1998), caracterização da atividade *in vitro* das enzimas nitrato redutase e superóxido dismutase (Rossa, 1999; Rossa *et al.*, 2002) e transformação gênica transiente por biobalística (Chow *et al.*, 2004a) foram alvo de investigações desenvolvidas no Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” do Instituto de Biociências da USP (LAM-IB/USP). Além disso, existem trabalhos referentes à cultura de tecido (Yokoya, 2000), à composição de aminoácidos e ao conteúdo tecidual de nitrogênio de *Gp. tenuifrons* (Lourenço *et al.*, 2002) e às propriedades físico-químicas do ágar dessa espécie (Matsubara, 1997; Zecchin *et al.*, 2000). Entretanto, estudos sobre o metabolismo do nitrogênio e composição química são escassos para *Gp. tenuifrons*.

1.3. O nitrogênio no ambiente marinho

Nitrogênio e fósforo são considerados os nutrientes que potencialmente limitam a produtividade primária nos oceanos (Ryther & Dustan, 1971; Falkowski, 1997; Tyrrell, 1999). Na água do mar, o nitrogênio está presente na forma de nitrato (0 - 40 $\mu\text{mol N.kg}^{-1}$), nitrito (0 - 1 $\mu\text{mol N.kg}^{-1}$), amônio (0 - 1 $\mu\text{mol N.kg}^{-1}$), dinitrogênio (1000 $\mu\text{mol N.kg}^{-1}$) e nitrogênio orgânico dissolvido (Tyrrell, 1999), e o fósforo essencialmente como fosfato inorgânico (Falkowski, 1997).

Em estudos sobre limitação de nutrientes, dois conceitos têm sido empregados para ajudar a compreender as diferentes abordagens adotadas: i) nutriente limitante imediato,

cuja adição provoca um aumento em curto prazo da produtividade primária em um determinado ambiente e ii) nutriente limitante definitivo, cuja disponibilidade regula a produtividade primária por um longo período de tempo (Tyrrell, 1999).

Trabalhos que consideram o fósforo como nutriente limitante definitivo fundamentam-se na grande disponibilidade de dinitrogênio nos oceanos e na atmosfera que poderia ser reduzido a amônio pelas cianobactérias fixadoras de nitrogênio, enquanto que não existe fonte atmosférica de fósforo e sua concentração na água do mar mantém-se sempre baixa (Falkowski, 1997; Tyrrell, 1999). Além disso, alguns autores apontam que a atividade dos organismos fixadores depende, entre outros fatores, da disponibilidade de fósforo na água do mar (Karl *et al.*, 1997; Moutin *et al.*, 2005).

Por outro lado, águas oligotróficas (pobre em nutrientes) retêm sempre um pequeno resíduo de fosfato, mesmo quando o nitrato é indetectável (Ryther & Dustan, 1971; Tyrrell, 1999). Dessa forma, alguns autores afirmam que o nutriente limitante definitivo no ambiente marinho seria o nitrogênio (Ryther & Dustan, 1971). Falkowski (1997) considera que a produtividade primária nos oceanos é regulada pela dinâmica do ciclo do nitrogênio e, além disso, afirma que não existem evidências geológicas de que o fósforo tenha limitado a produtividade nos oceanos.

Apesar de não haver consenso sobre qual seria o nutriente limitante definitivo no ambiente marinho, vários estudos apontam o nitrogênio como o nutriente limitante imediato (Lobban & Harrison, 1994), uma vez que o aumento na disponibilidade de nitrogênio (na forma de nitrato ou amônio) proporcionou elevação das taxas de crescimento de diversas algas, por exemplo, da microalga *Nanochloris atomus* (Ryther & Dustan, 1971) e das rodófitas *Gracilaria foliifera*, *Neogardhiella baileyi* (DeBoer *et al.*, 1978), *Gracilaria tikvahiae* (Bird *et al.*, 1982; Lapointe & Duke, 1984; Hanisak, 1990) e *Gracilaria tenuistipitata* (García-Sánchez *et al.*, 1993).

1.4. Metabolismo do nitrato

O nitrogênio inorgânico solúvel, na forma de nitrato, nitrito ou amônio, é captado pelas células e incorporado na formação de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas nitrogenadas, em um processo conhecido como metabolismo de assimilação do nitrogênio (Chapman & Harrison, 1988; Lobban & Harrison, 1994).

A captação do nitrato, a principal fonte de nitrogênio disponível para as algas, é mediada pela enzima H⁺-ATPase localizada na membrana plasmática (Chapman & Harrison, 1988; Crawford, 1995; Tischner, 2000). Em plantas vasculares, foram

identificados três sistemas de transporte de nitrato, com base em suas propriedades cinéticas: i) constitutivo com alta afinidade ($K_m = 6-20 \mu\text{M}$), ii) induzível com alta afinidade ($K_m = 20-100 \mu\text{M}$) e iii) induzível com baixa afinidade (ativo em concentrações de nitrato superiores a $500 \mu\text{M}$) (Crawford & Glass, 1998; Glass, 2003). Segundo Rees *et al.* (2007), as propriedades cinéticas de captação de nitrato em macroalgas sugerem a existência de sistemas de alta afinidade. Além disso, o efeito do amônio sobre a captação de nitrato por *Ulva intestinalis* indicaria a presença de pelo menos dois sistemas: i) sensível a amônio e, possivelmente, regulado por este íon e ii) insensível a amônio (Rees *et al.*, 2007). Os autores afirmam também que as concentrações usadas na determinação das constantes cinéticas de captação de nitrato por macroalgas não são suficientemente altas para estabelecer a existência de um sistema de baixa afinidade (Rees *et al.*, 2007).

O nitrato, uma vez captado, pode ser estocado nos vacúolos e/ou reduzido a nitrito pela nitrato redutase (NR), uma enzima essencialmente citoplasmática que utiliza NAD(P)H como poder redutor (Eq. 1). O nitrito é transportado para o cloroplasto e, através da enzima nitrito redutase (NiR), é reduzido a amônio, utilizando ferredoxina reduzida (Fd-red) como fonte redutora (Eq. 2). O amônio é posteriormente incorporado ao glutamato (esqueleto carbônico imediato) pela ação da enzima glutamina sintetase (GS), originando glutamina (Eq. 3). O grupo amida da glutamina é transferido para o 2-oxoglutarato, através da enzima glutamina:2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT), que utiliza NADH (Eq. 4a) ou Fd-red (Eq. 4b) como poder redutor, formando duas moléculas de glutamato. Uma vez assimilado em glutamina e glutamato, o nitrogênio é incorporado em outros aminoácidos por meio de reações de transaminação, catalisadas por aminotransferases (AT) (Figura 1.2) (Crawford, 1995; Lobban & Harrison, 1994; Tischner, 2000; Taiz & Zeiger, 2004; Suzuki & Knaff, 2005).

Antes da descoberta da via de assimilação GS/GOGAT, acreditava-se que a incorporação do amônio ocorresse unicamente com a formação de glutamato pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) (Eq. 5). Alguns trabalhos com macroalgas indicam que a GDH possui baixa afinidade pelo amônio e que a principal via de assimilação deste íon é através da GS/GOGAT (Lobban & Harrison, 1994). Atualmente, considera-se que a principal função da GDH esteja relacionada ao catabolismo do glutamato, formando 2-oxoglutarato, que pode ser utilizado no ciclo de Krebs (Taiz & Zeiger, 2004).

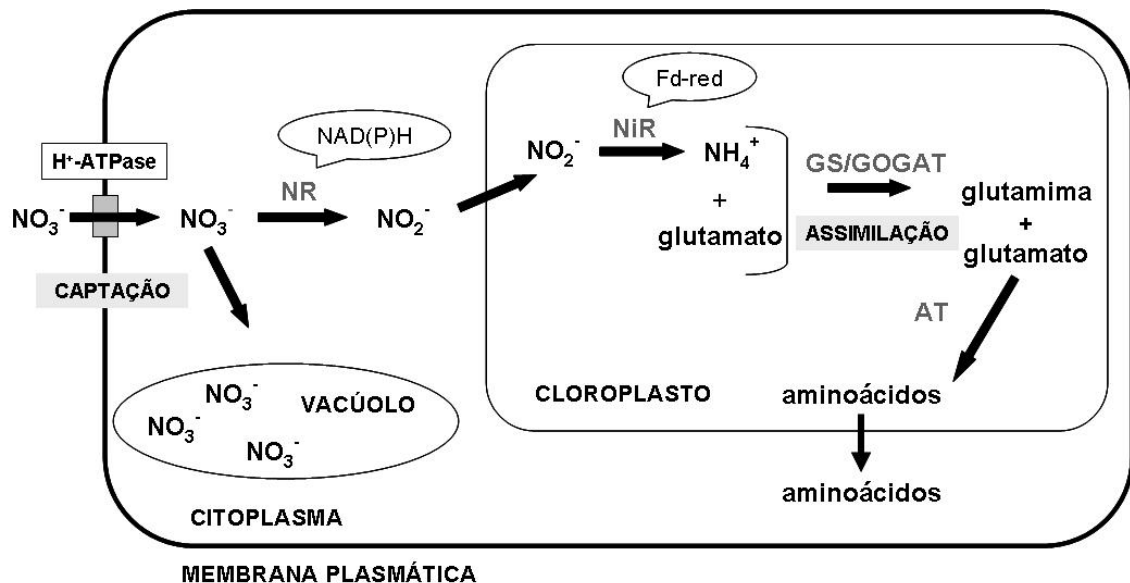
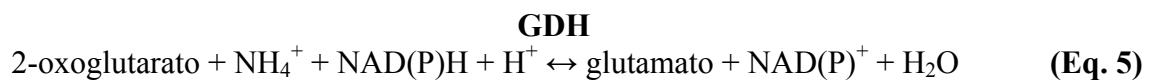
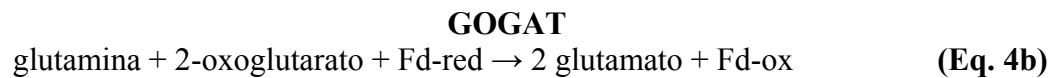
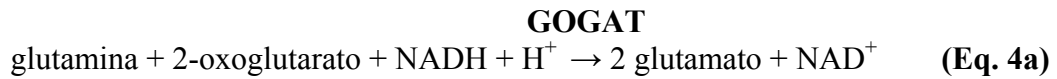
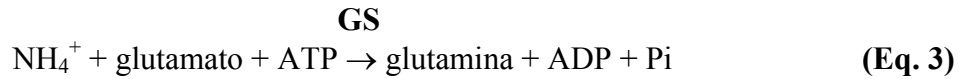
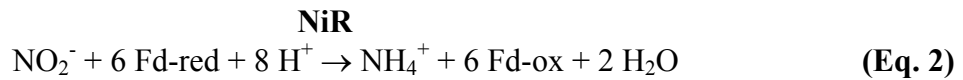


Figura 1.2. Esquema da assimilação de nitrato. NR = nitrato redutase; NiR = nitrito redutase; GS = glutamina sintetase; GOGAT = glutamina:2-oxoglutarato aminotransferase; AT = aminotransferase.

Enquanto a assimilação de nitrato ocorre através de uma seqüência de reações na via metabólica, o amônio captado é diretamente incorporado na formação de macromoléculas nitrogenadas, através das enzimas GS/GOGAT (Eq. 3, 4a e 4b), propiciando um menor gasto energético. Este fato tem sido apontado para explicar a preferência na captação de amônio apresentada por algumas espécies de algas (D'Elia & DeBoer, 1978; Ryther *et al.*, 1981; Hanisak, 1990; Haglund & Pedersén, 1993; Lobban & Harrison, 1994; Smit, 2002; Cohen & Fong, 2004; Nishihara *et al.*, 2005).

Entretanto, a preferência pela fonte de nitrogênio depende de sua taxa de captação, que é influenciada pelas condições de luminosidade e temperatura, pela sua concentração externa e pelo estoque interno de nitrogênio da alga, entre outros fatores (Lapointe *et al.*, 1984; Hanisak, 1990; Lobban & Harrison, 1994). A luz afeta a captação de nutrientes indiretamente através da fotossíntese que: i) fornece energia (ATP) para o transporte ativo, ii) produz esqueletos de carbono que são necessários para a incorporação do nitrogênio em macromoléculas orgânicas e iii) aumenta a taxa de crescimento, desencadeando uma maior necessidade de nutrientes (Lobban & Harrison, 1994). Nishihara *et al.* (2005) observaram aumento na taxa de captação de nitrato e amônio por *Laurencia brongniartii* com a elevação da irradiância e atribuíram este resultado ao consumo das reservas internas de nitrogênio devido ao aumento da atividade fotossintetizante. A temperatura afeta a conformação de macromoléculas e a cinética das reações químicas (Lapointe *et al.*, 1984; Lobban & Harrison, 1994). As taxas máximas de captação de nitrato e amônio foram reduzidas em *Fucus spiralis* submetida a baixas temperaturas (Topinka, 1978). Para *L. brongniartii* o aumento da temperatura provocou incremento na taxa de captação de nitrato, mas não teve efeito sobre o amônio (Nishihara *et al.*, 2005). Segundo Smit (2002), as algas são mais sensíveis a variações ambientais quando suas reservas intracelulares de nitrogênio estão esgotadas.

Nitrito e amônio, ambos intermediários da via de assimilação do nitrato, são citotóxicos, devendo, portanto, ser incorporados a moléculas orgânicas (ex. aminoácidos e proteínas) para prevenir seu acúmulo. Como a assimilação de nitrogênio inorgânico requer esqueletos carbônicos, ATP e compostos redutores (NAD(P)H e Fd-red), considera-se que esta via metabólica esteja acoplada à fotossíntese, sendo que a integração destes importantes processos metabólicos possui finos mecanismos de regulação da expressão e da atividade dessa via enzimática (Turpin, 1991; Crawford & Arst, 1993). A NR, como primeira enzima dessa via de redução, controla a taxa de assimilação de nitrato, sendo o ponto chave na regulação deste processo (De la Rosa *et al.*, 1989; Solomonson & Barber, 1990; Berges, 1997; Lartigue & Sherman, 2005).

1.5. Nitrato redutase

A NR é uma enzima multimérica, sendo que cada monômero contém três grupos prostéticos: FAD, heme-Fe e molibdênio-molibdopterina (Mo-MPT) (Solomonson & Barber, 1990; Campbell, 2001). Cada monômero possui oito regiões (Figura 1.3): i) seqüência N-terminal, ii) domínio Mo-MPT, com o sítio ativo que reduz o nitrato,

iii) domínio interface, iv) *Hinge 1*, contendo um resíduo de serina que pode ser fosforilado, regulando a atividade da enzima, v) domínio citocromo *b*, onde está ligado o grupo heme-Fe, vi) *Hinge 2*, que possui um sítio proteolítico, vii) domínio FAD, que contém o sítio ativo onde a enzima é reduzida (NAD(P)H transfere elétrons) e viii) seqüência *C*-terminal onde se liga o NAD(P)H (Campbell, 2001).

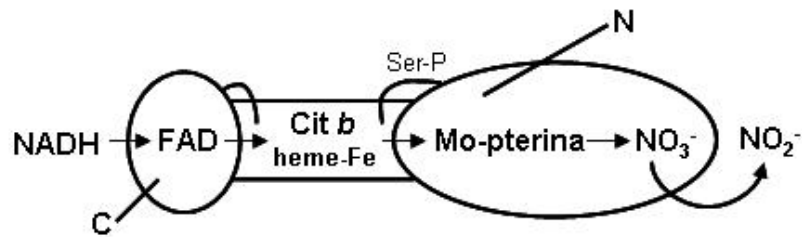


Figura 1.3. Modelo estrutural da nitrato redutase (NR). C = seqüência *C*-terminal; Ser-P = serina fosforilada; N = seqüência *N*-terminal (modificado de Campbell, 2001).

A NR pode ser regulada em diferentes níveis, incluindo controles transcricionais e pós-transcricionais (síntese e degradação do mRNA) (Solomonson & Barber, 1990; Crawford & Arst, 1993) e controles pós-traducionais por modulação redox e alostérica (De la Rosa, 1989), fosforilação/desfosforilação (Crawford & Arst, 1993; Kaiser & Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004) ou degradação da enzima NR (Solomonson & Barber, 1990). Aparentemente, o principal mecanismo de regulação imediata, em curto prazo, é pós-traducional, através de processos de fosforilação/desfosforilação, que envolvem a ação das enzimas proteína quinase (PK) e proteína fosfatase do tipo 2A (PP2A) e a ligação de proteínas inibitórias da família 14-3-3 à forma fosforilada da NR (forma inativa; Figura 1.4). O balanço entre as atividades das proteínas quinases e fosfatases envolvidas na regulação pós-traducional da NR determina o nível metabólico desta enzima (Lillo *et al.*, 2004).

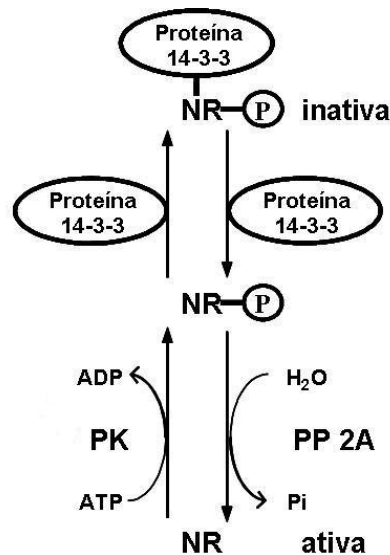


Figura 1.4. Modelo da regulação pós-traducional da nitrato redutase (NR) por fosforilação e desfosforilação, envolvendo as enzimas proteína quinase (PK) e proteína fosfatase do tipo 2A (PP2A) e a ligação de proteínas inibitórias da família 14-3-3 (modificado de Buchanan *et al.*, 2000).

A atividade da NR é influenciada por diversos fatores ambientais e intracelulares, incluindo quantidade e qualidade de luz, concentração de compostos nitrogenados, CO₂, relógio biológico, metabólitos do nitrogênio e do carbono (Crawford & Arst, 1993). Para a maioria das espécies de algas estudadas, a atividade da NR é regulada principalmente pela disponibilidade de nitrato e luz (Lopes *et al.*, 1997; Rossa, 1999; Granbom *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2002; Lartigue & Sherman, 2005; Chow *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2007; Chow & Oliveira, 2008).

Em *Enteromorpha* sp., a atividade da NR aumentou quando a alga foi exposta a nitrato. Entretanto, a elevada atividade da enzima não foi suficiente para consumir o estoque intracelular de nitrato tão rapidamente quanto ele era preenchido (Lartigue & Sherman, 2005). Os autores sugerem que a presença ou ausência de nitrato na água do mar, ao invés do estoque interno deste nutriente, determinaria a atividade da NR em *Enteromorpha* sp. (Lartigue & Sherman, 2005). Young *et al.* (2007) também observaram um aumento na atividade da NR de algas pardas em resposta a uma maior disponibilidade de nitrato. Porém, a relação entre o estoque interno de nitrato e a atividade da enzima não foi clara, sugerindo, da mesma forma, que a NR não seria fortemente regulada pela concentração intracelular de nitrato (Young *et al.*, 2007). Em *Gracilaria chilensis* também foi verificado aumento da atividade da NR com o incremento de nitrato no meio de cultivo (Chow & Oliveira, 2008).

Na maioria das espécies, o pico de atividade da NR ocorre entre a quarta e sexta hora após o início do fotoperíodo e a atividade da enzima mostra-se constitutiva durante a fase de escuro (Deng *et al.*, 1990; Gao *et al.*, 1992; Lopes *et al.*, 1997, 2002; Rossa, 1999; Granbom *et al.*, 2004; Chow *et al.*, 2004b). Em plantas vasculares, duas isoformas da NR foram identificadas: uma induzível e regulada por fatores ambientais (ex. nitrato e luz) e outra constitutiva que mantém a taxa basal de atividade, característica da fase de escuro (Lillo, 1994). Lopes *et al.* (1997) atribuíram a atividade basal verificada na fase de escuro em *G. tenuistipitata* a uma suposta NR constitutiva.

Tem sido sugerido que a atividade da NR estaria acoplada ao período de luz devido à toxicidade do nitrito (Duke & Duke, 1984). A importância da luz na promoção da atividade da NR seria indireta e estaria relacionada ao metabolismo do carbono, tendo sido demonstrado que algas e plantas vasculares assimilam nitrato no escuro desde que uma fonte de carbono seja provida (Corzo & Niell, 1991; Huppe & Turpin, 1994). Por outro lado, Giordano *et al.* (2005) sugerem que a atividade da NR seria regulada pelo estado redox do estoque da plastoquinona. A plastoquinona é uma molécula apolar, que se difunde na membrana do tilacóide carregando elétrons do fotossistema II para o fotossistema I (Taiz & Zeiger, 2004). Quando a redução do estoque fosse bloqueada, como ocorre na fase de escuro, tanto a transcrição quanto a atividade da NR seriam suprimidas. Entretanto, as vias de sinalização envolvidas nestes processos não são totalmente compreendidas (Giordano *et al.*, 2005).

Sendo a NR o ponto chave na regulação da assimilação de nitrato (De la Rosa *et al.*, 1989; Solomonson & Barber, 1990), alguns autores afirmam que a atividade desta enzima poderia ser utilizada para caracterizar o estado nutricional de macroalgas (Davison & Stewart, 1984; Thomas & Harrison, 1988).

1.6. Efeito do nitrogênio sobre a composição química de macroalgas

Além do crescimento e da atividade da NR, a disponibilidade de nutrientes afeta a composição química das macroalgas. Por isso, outros parâmetros fisiológicos, como concentração de pigmentos fotossintetizantes, teor de proteínas solúveis ou razão entre carbono e nitrogênio tecidual são amplamente utilizados para caracterizar o estado nutricional de macroalgas.

Os principais pigmentos fotossintetizantes das algas vermelhas são clorofila *a* e ficobiliproteínas (Kursar *et al.*, 1983), sendo que estas estão organizadas em uma estrutura denominada ficobilissomo, aderido à membrana externa do tilacóide do cloroplasto

(Glazer, 1982; Porra *et al.*, 1997). Mais internamente no ficobilissomo está localizada a alofocianina, seguida da ficocianina e, mais externamente, a ficoeritrina (Glazer, 1982; Porra *et al.*, 1997). Considera-se que as ficobiliproteínas, especialmente a ficoeritrina, constituem uma das principais reservas intracelulares de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo uma das primeiras macromoléculas consumidas quando a alga encontra-se sob limitação de nitrogênio (Bird *et al.*, 1982; Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999) e o pigmento que mais rápido responde à disponibilidade deste nutriente no meio (Vergara & Niell, 1993). Acredita-se que o conteúdo de alofocianina (menos de 5% do total de ficobiliproteínas) seja constante, independentemente das condições ambientais (De Marsac *et al.*, 1988). A clorofila *a* também é considerada uma reserva de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo que diversos estudos reportam diminuição na concentração deste pigmento em algas submetidas à baixa disponibilidade de nitrogênio (García-Sánchez *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999; Costa, 2005; Martins, 2007).

Outras proteínas solúveis, incluindo enzimas envolvidas na fotossíntese, como a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), podem ser consumidas pelas algas sob limitação de nitrogênio (Küppers & Weidner, 1980; Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1993; Andria *et al.*, 1999). Isto, juntamente com a diminuição dos pigmentos fotossintetizantes nitrogenados, leva a uma redução das taxas fotossintetizantes (Küppers & Weidner, 1980; Lapointe & Duke, 1984; Turpin, 1991) e, conseqüentemente, a um decréscimo das taxas de crescimento (Bird *et al.*, 1982; Lapointe & Duke, 1984; Hwang *et al.* 1987).

Em algas sob limitação de nitrogênio, a razão entre carbono e nitrogênio tecidual aumenta devido à utilização das reservas celulares de nitrogênio (aminoácidos livres, pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis) e ao aumento nas concentrações de carbono (Lapointe, 1981; Lapointe & Duke, 1984; Hwang *et al.*, 1987; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999; Costa, 2005). O aumento no teor de carbono pode estar relacionado ao acúmulo de amido das florídeas e floridosídeo, como verificado para *G. tenuistipitata* (Collén *et al.*, 2004). Li *et al.* (2001) observaram que em culturas de *Porphyridium* sp. submetidas à escassez de nitrato ocorre um aumento de até 1500% no conteúdo de polissacarídeos solúveis, especialmente floridosídeo. Isto suporta a premissa de que em Rhodophyta estes compostos atuam como reserva dinâmica de carbono (Yu *et al.*, 2002; Collén *et al.*, 2004). Ao contrário, em condições de alta disponibilidade de nitrogênio o conteúdo de carbono diminui em resposta à assimilação do nitrogênio (García-Sánchez *et*

al., 1993; Vergara *et al.*, 1995). Portanto, a razão entre carbono e nitrogênio tecidual é um parâmetro associado à nutrição em longo prazo (Barr & Rees, 2003).

A disponibilidade de nitrogênio também pode afetar o rendimento e a qualidade do ágar. Em *G. tikvahiae* e *G. foliifera* foi verificada uma redução do rendimento de ágar quando as algas foram cultivadas em meio enriquecido com nitrogênio (DeBoer, 1978; Bird *et al.*, 1981). Entretanto, a qualidade do ágar, estimada pela força do gel, foi melhor quando as algas foram cultivadas sob concentrações moderadas ou altas de nitrogênio (Bird *et al.*, 1981). Em *Gracilaria bursa-pastoris* foi observada correlação negativa entre rendimento de ágar e conteúdo tecidual de nitrogênio. Porém, o teor de nitrogênio não estava relacionado à força do gel (Marinho-Soriano & Bourret, 2003). Ao contrário, em *Gracilaria gracilis* e *Gracilaria dura*, não foi constatada correlação entre rendimento do ágar e nitrogênio tecidual (Marinho-Soriano & Bourret, 2003; 2005). Em *G. dura* também foi observada correlação positiva entre nitrogênio e teor de 3,6-AG (Marinho-Soriano & Bourret, 2005).

Pesquisas referentes à influência do nitrogênio sobre o metabolismo das macroalgas são importantes uma vez que este composto é essencial para a manutenção de diversas vias metabólicas do organismo e pode estar presente na água oriunda de sistemas agrícolas e nos esgotos domésticos e industriais, podendo atingir águas costeiras (Hooda *et al.*, 2000; Hooda, 2008). Além disso, o nitrogênio também é produto da aquicultura, sendo excretado pelos invertebrados e peixes cultivados (Chopin *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 2001). A extrapolação de resultados obtidos em laboratório para o ambiente natural deve ser cautelosa, porém tais estudos são relevantes para a compreensão da fisiologia de uma determinada espécie (Costa, 2005) e o estabelecimento de modelos de funcionamento metabólico.

2. Objetivo

2. Objetivo

Tendo em vista a importância das algas gracilarióides e a influência da disponibilidade de nitrogênio sobre diversos aspectos do metabolismo das macroalgas, o presente trabalho teve como objetivo fornecer subsídios para a compreensão do metabolismo do nitrogênio em *Gracilariopsis tenuifrons*, abordando as respostas fisiológicas e bioquímicas do organismo sob diferentes condições de nitrato, em laboratório.

Para cumprir tal objetivo, foram contemplados os seguintes objetivos específicos, cultivando-se *Gp. tenuifrons* em diferentes concentrações de nitrato:

- i) Avaliar as taxas crescimento e o conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio;
- ii) Analisar a atividade *in vitro* da NR e sua resposta frente ao aumento de irradiância ou suprimento de uma fonte de carbono;
- iii) Avaliar a taxa de captação e a porcentagem de remoção de nitrato e fosfato;
- iv) Determinar o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes (ficobiliproteínas e clorofila *a*) e proteína solúvel total;
- v) Avaliar o rendimento e a qualidade dos polissacarídeos.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Procedência do material biológico

Foi estabelecido um cultivo estoque unialgáceo de *Gracilariopsis tenuifrons*, correspondente à fase gametofítica feminina (Figura 3.1), por meio da repicagem dos exemplares do lote 39 do Banco de Germoplasma do LAM-IB/USP. Os exemplares deste lote foram obtidos a partir da germinação de tetrásporos, originados de tetrásporófitos coletados pela Profa. Dra. Estela Maria Plastino em 6 de julho de 1987 na lagoa de Araruama, Cabo Frio, RJ.



Figura 3.1. Aspecto geral dos gametófitos femininos de *Gracilariopsis tenuifrons* utilizados neste estudo.

3.2. Condições gerais do cultivo estoque *in vitro* de *Gracilariopsis tenuifrons*

O cultivo estoque foi mantido em água do mar esterilizada de salinidade 32 ups enriquecida com solução de von Stosch (VS; Edwards, 1970; Tabela 3.1) diluída a 50% (correspondente a 250 μM de nitrato), em uma proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, sob temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 14 h e 10 h de escuro, irradiância de 65 ± 5 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e aeração em períodos alternados de 30 min.

A limpeza dos talos e a troca do meio de cultivo foram realizadas semanalmente. Quando necessário, foram adicionados 2 mL.L^{-1} de dióxido de germânio de uma solução estoque de 2 mg.L^{-1} a fim de minimizar a contaminação por diatomáceas (Lewin, 1966). Para controlar a eventual proliferação de cianofíceas, foi adicionada penicilina G potássica na concentração de 25 mg.L^{-1} durante 48 h (Hoshaw & Rodowski, 1973). Após o tratamento com o antibiótico, os talos foram lavados abundantemente em água do mar esterilizada para retirar os contaminantes e resquícios da droga.

A água do mar foi coletada no litoral do município de São Sebastião (SP), com salinidade média de 32 ups. Sua esterilização foi realizada mediante dupla filtragem sob pressão em filtros com porosidade de 5 e 1 μm (Cuno) e posterior aquecimento em banho-maria a 90 °C, durante 60 min, contados a partir do momento da fervura (Oliveira *et al.*, 1995). A irradiância foi fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” (Osram 40 W) e periodicamente mensurada com um medidor de quanta (LI-COR, modelo LI-250A), utilizando um sensor esférico (LI-COR, modelo LI-193). A aeração foi fornecida por um compressor odontológico de diafragma isento de óleo (Schulz).

Tabela 3.1. Soluções estoque para a preparação de solução de enriquecimento de von Stosch (VS; Edwards, 1970). Meio de cultivo enriquecido com VS 50% corresponde a 4 mL da solução de enriquecimento em água do mar, totalizando 1 L de meio.

Reagentes	Soluções em água destilada	Volumes parciais utilizados
EDTA	0,4650 g/100 mL	100 mL
NaNO ₃	5,3125 g/100 mL	100 mL
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	1,3438 g/100 mL	100 mL
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,0869 g/100 mL	100 mL
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,0124 g/500 mL	100 mL
Tiamina	0,1000 g/100 mL	25 mL
Biotina	0,0125 g/100 mL	1 mL
Cianocobalamina	0,0125 g/100 mL	1 mL
Volume final em água destilada		1000 mL

3.3. Delineamento experimental: influência da disponibilidade de nitrato no meio de cultivo sobre crescimento, atividade da nitrato redutase, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gracilariopsis tenuifrons*

3.3.1. Crescimento, conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio e atividade *in vitro* da NR

Ápices de 2 cm, provenientes do cultivo estoque, foram cultivados em diferentes concentrações de nitrato (acrescido na forma de NaNO₃), na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. O tratamento controle foi mantido apenas em água do mar. O meio de cultivo dos demais tratamentos consistia em água do mar acrescida de solução VS sem nitrato em sua formulação (VS-N) diluída a 50% e de diferentes concentrações de nitrato (0, 50, 150, 250, 500 ou 750 μM). Foi adicionado VS-N 50% para evitar limitação de outros nutrientes e, assim, avaliar as respostas da alga unicamente à disponibilidade de nitrato no meio de cultivo. Os tratamentos e a nomenclatura dada a eles

estão detalhados na Tabela 3.2. As demais condições de experimentação foram mantidas como descrito no item 3.2. A Figura 3.2 ilustra o sistema de cultivo das algas mantidas em diferentes concentrações de nitrato.

Tabela 3.2. Descrição dos tratamentos com as diferentes concentrações de nitrato estudadas.

Tratamentos	Descrição
Água do mar	Controle sem adição de nutrientes, apenas água do mar esterilizada
VS-N 50%	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50%
VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 50 μM de nitrato
VS-N 50% + 150 $\mu\text{M NO}_3^-$	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 150 μM de nitrato
VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 250 μM de nitrato
VS-N 50% + 500 $\mu\text{M NO}_3^-$	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 500 μM de nitrato
VS-N 50% + 750 $\mu\text{M NO}_3^-$	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 750 μM de nitrato

Antes do início do experimento de crescimento, os ápices foram mantidos por três semanas sob as mesmas condições a serem testadas (pré-tratamento) e, então, cortados novamente em 2 cm. Este pré-tratamento foi realizado a fim de assegurar condições fisiológicas e bioquímicas estáveis (Lapointe & Duke, 1984). Nas quatro semanas subseqüentes, o crescimento foi avaliado semanalmente, coincidindo com a renovação do meio de cultivo.

Ao fim do experimento de crescimento, os ápices foram cortados em 2 cm e incubados com seus respectivos meios de cultivo por 24 h. Após este período, os ápices foram pesados e, posteriormente, parte do material foi seca em estufa a 60 °C para determinação da porcentagem de massa seca e do conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio (CNH), e parte congelada em nitrogênio líquido e mantida em freezer a -80 °C para análise da atividade *in vitro* da NR. Esta etapa foi realizada entre 4 e 6 h após o início do fotoperíodo para evitar a influência da flutuação circadiana de diversos processos metabólicos sobre os parâmetros em estudo.



Figura 3.2. Sistema de cultivo *in vitro* de *Gracilariopsis tenuifrons* em câmara com condições abióticas controladas.

3.3.2. Atividade *in vitro* da NR frente ao aumento de irradiância ou suprimento de uma fonte de carbono

Com base nos resultados de atividade *in vitro* da NR (item 3.3.1), o tratamento com adição de 250 μM de nitrato foi selecionado para a análise da atividade da enzima frente ao aumento de irradiância ou suprimento de uma fonte de carbono.

Ápices de 2 cm, provenientes do cultivo estoque, foram mantidos em VS-N 50% + 250 μM NO_3^- , na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. As demais condições seguiram as especificações do item 3.2.

Após três semanas de pré-tratamento e o corte dos ápices em 2 cm, os mesmos permaneceram em cultivo durante as quatro semanas seguintes sob as mesmas condições.

Ao fim desse período, os ápices foram novamente cortados em 2 cm e mantidos em VS-N 50% + 250 μM NO_3^- por 24 h. O experimento foi realizado dentro das duas horas subsequentes, período de máxima atividade da enzima (ente 4 e 6 h após o início do fotoperíodo). Aliquotas de 70 mg de massa fresca foram incubadas em 70 mL do mesmo meio de cultivo por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min, em três diferentes condições: i) sob $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) sob $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) sob $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} + 0,3 \text{ M glicerol}$. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até a análise da atividade enzimática. Glicerol foi escolhido por ser uma fonte de carbono efetiva para o crescimento de explantes

de *Grateloupia doryphora*, sendo que o crescimento foi maior naqueles cultivados em meio com 0,3 M glicerol (Robaina *et al.*, 1990).

O meio de cultivo foi armazenado a -20 °C para estimar a porcentagem de remoção de nitrato após as 24 h de incubação dos ápices e durante o experimento, a fim de avaliar uma possível variação nesse parâmetro com o fornecimento de maior irradiância ou glicerol.

3.3.3. Taxa de captação e porcentagem de remoção de nitrato e fosfato e conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e proteína solúvel total

Com base nos dados de crescimento, conteúdo tecidual de CNH e atividade *in vitro* da NR obtidos no experimento descrito no item 3.3.1, foram selecionadas quatro concentrações de nitrato para a avaliação da taxa de captação e a porcentagem de remoção de nitrato e fosfato do meio de cultivo e análise de reservas intracelulares de nitrogênio (pigmentos fotossintetizantes e proteína solúvel total). As concentrações selecionadas foram 0, 50, 150 e 250 µM de nitrato (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Descrição dos tratamentos com as concentrações de nitrato selecionadas.

Tratamentos	Descrição
VS-N 50%	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50%
VS-N 50% + 50 µM NO ₃ ⁻	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 50 µM de nitrato
VS-N 50% + 150 µM NO ₃ ⁻	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 150 µM de nitrato
VS-N 50% + 250 µM NO ₃ ⁻	Água do mar + VS sem nitrato diluído a 50% + 250 µM de nitrato

O delineamento experimental seguiu o descrito no item 3.3.1. Semanalmente, coincidindo com renovação do meio de cultivo, foram armazenadas em freezer a -20 °C amostras de 100 mL de água do mar, para a determinação da concentração de nitrato, nitrito, amônio e fosfato inorgânico dissolvidos, e de meio de cultivo, antes e após a incubação das algas, para a quantificação de nitrato e fosfato dissolvidos. Ao término das quatro semanas de experimento, os ápices foram cortados em 2 cm e mantidos com seus respectivos meios de cultivo por 24 h. Após este período, os ápices foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80 °C para determinação do conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e proteína solúvel total, e o meio de cultivo foi armazenado a -20 °C para análise da concentração de nitrato e fosfato.

3.3.4. Rendimento e qualidade dos polissacarídeos

Os tratamentos com *Gp. tenuifrons* selecionados no primeiro experimento (Tabela 3.3) também foram avaliados quanto ao rendimento e à qualidade dos polissacarídeos.

O desenho experimental foi semelhante ao delineado no item 3.3.1. Porém, os ápices mediam 5 cm e foram mantidos na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, devido à maior necessidade de material algáceo para as análises. Em virtude da mudança na proporção de massa fresca por volume de meio de cultivo, crescimento e conteúdo tecidual de CNH foram novamente avaliados. Ao fim do período experimental, os ápices foram cortados em 5 cm e incubados com seus respectivos meios de cultivo por 24 h. Em seguida, os ápices foram pesados e, posteriormente, secos em estufa a 60 °C para determinação da porcentagem de massa seca, do conteúdo tecidual de CNH e análise dos polissacarídeos.

3.4. Parâmetros analisados

3.4.1. Taxa de crescimento

As taxas de crescimento (TCs) foram calculadas segundo a fórmula descrita por Lignell & Pedersén (1989):

$$TC = [(MFf/MFi)^{1/t} - 1] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde MFf = massa fresca final, MFi = massa fresca inicial e t = tempo. O resultado foi expresso em %·d⁻¹.

3.4.2. Porcentagem de massa seca

A porcentagem de massa seca foi determinada após a secagem das algas em estufa a 60 °C até a obtenção de massa constante.

3.4.3. Conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio

A quantificação dos elementos foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP, com o uso de um analisador de composição elementar CNH Perkin-Elmer, modelo 2400.

As amostras secas em estufa a 60 °C foram trituradas em almofariz até a formação de um pó fino e liofilizadas (Labconco, Freeze Dry System - Freezone 4,5). Alíquotas de 1 mg foram carbonizadas a 925 °C em presença de oxigênio puro, desencadeando a completa oxidação da matéria presente nas amostras. Todo o carbono presente nas amostras foi convertido em CO₂, o hidrogênio em H₂O e o nitrogênio em N₂. A mistura resultante foi

direcionada para uma coluna cromatográfica, onde os componentes foram separados e, então, detectados através de mudanças na condutividade térmica dos produtos. O conteúdo total de carbono, nitrogênio e hidrogênio das amostras foi calculado de acordo com o percentual dos elementos obtidos na análise CHN e padronizados pela massa seca da alga. Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

3.4.4. Atividade *in vitro* da NR

A atividade *in vitro* da NR foi determinada segundo Rossa (1999), com modificações descritas no Apêndice I.

Amostras de 70 mg de massa fresca foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido, suspensas em um tampão de extração (0,2 M tampão fosfato de sódio, pH 8,0 [2,8% *p/v* $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ e 97,2% *p/v* $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$]; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,3% *p/v* BSA) e centrifugadas a 12000 rpm e 4 °C por 15 min (Hettich Zentrifugen, Mikro 22R). O sobrenadante (extrato bruto) foi recolhido e incubado em um tampão de reação a 25 °C (0,2 M tampão fosfato de sódio, pH 8,0; 6 mM KNO_3 ; 0,5 mM MgSO_4) com adição de 0,04 mM NADH para iniciar a reação enzimática. Controles sem a adição de NADH foram realizados para cada tratamento. A reação foi interrompida com 1,4 mM ZnSO_4 e 43% *v/v* etanol e o material centrifugado a 12000 rpm e 4 °C por 10 min (Hettich Zentrifugen, Mikro 22R). A concentração de nitrito produzido pela atividade da NR foi determinada espectrofotometricamente (Hewlett Packard, 8452A) pela absorção a 543 nm, usando uma cubeta de polipropileno de percurso óptico de 1 cm, logo após a adição de 9,6 mM sulfanilamida e 0,7 mM *n*-(1-naftil)-etilenodiamina diidrocloreto (NED). Uma solução de NaNO_2 0,1 mM foi usada para a confecção da curva padrão. A atividade *in vitro* da NR (ANR) foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{ANR} = (\text{EBt} \cdot \text{NO}_2^- \text{ produzido}) / (\text{EBi} \cdot t \cdot \text{MF}) \quad (2)$$

Onde EBt = volume de extrato bruto total, EBi = volume de extrato bruto incubado, t = tempo de incubação e MF = massa fresca. O resultado foi expresso em $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$, assumindo-se que 1 unidade de atividade da NR (U) corresponde a 1 μmol de nitrito produzido por minuto (Chapman & Harrison, 1988), sob temperatura constante de 25 °C.

Os resultados de atividade da NR foram convertidos em atividade específica da NR, uma vez que alguns dados na literatura são baseados na quantidade de proteína solúvel total. Para tanto, o teor de proteína solúvel total foi quantificado a partir de uma alíquota do extrato bruto, sem adição de BSA (item 3.4.7). O cálculo da atividade específica da NR ($A_{\text{esp}}^{\text{NR}}$) foi feito através da fórmula:

$$A_{\text{esp}}\text{NR} = \text{ANR}/\text{PS} \quad (3)$$

Onde ANR = atividade *in vitro* da NR e PS = proteína solúvel total. Os resultados foram expressos em $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

3.4.5. Taxa de captação e porcentagem de remoção de nitrato e fosfato

As análises de nutrientes dissolvidos nas amostras de água do mar e de meio de cultivo foram realizadas no Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços do Mar do Instituto Oceanográfico da USP, com colaboração da Profa. Dra. Elisabete de Santis Braga e do técnico Vitor Gonzalez Chiozzini.

Os frascos plásticos para armazenagem da água do mar e do meio de cultivo foram previamente lavados com HCl 10%, enxaguados abundantemente com água destilada e secos em estufa a 40 °C.

Foram analisadas as concentrações de nitrato, nitrito, amônio e fosfato inorgânico presentes na água do mar e de nitrato e fosfato no meio de cultivo antes da incubação das algas e os teores remanescentes no mesmo após o período de cultivo.

A quantificação de nitrato e nitrito foi realizada de acordo com o método descrito por Tréguer & Le Corre (1975), com modificações (Braga, 1997), utilizando-se o equipamento automático Auto Analyzer II (Bran Luebbe). A redução do nitrato a nitrito foi feita através de sua passagem por uma coluna de cádmio cuperizado. Por diferença do valor obtido na análise de nitrito, feita simultaneamente e a partir da mesma amostra, foi encontrado o valor da concentração de nitrato. Soluções de KNO_3 0,1 mM e de NaNO_2 0,1 mM foram usadas para a confecção da curva padrão de nitrato e nitrito, respectivamente.

O amônio foi determinado pelo método de Tréguer & Le Corre (1975), utilizando-se um espectrofotômetro digital (Milton Roy, modelo Genesis II). Foi usada uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 mM como padrão.

A concentração de fosfato foi determinada de acordo com Grasshoff *et al.* (1983), utilizando-se um espectrofotômetro digital (Milton Roy, modelo Genesis II). Uma solução de K_2PO_4 0,1 mM foi usada para a confecção da curva padrão.

O cálculo da taxa de captação (Captação) de nitrato e fosfato baseou-se na fórmula descrita por Kreting *et al.* (2008):

$$\text{Captação} = ([\text{inicial}] - [\text{final}]) \cdot \text{vol}/(\text{MF} \cdot t) \quad (4)$$

Onde [inicial] = concentração do nutriente no tempo zero, [final] = concentração do nutriente após um período de tempo, vol = volume do meio de cultivo, MF = massa fresca e t = tempo. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

A porcentagem de remoção (Remoção) de nitrato e fosfato do meio de cultivo foi calculada de acordo com a expressão:

$$\text{Remoção} = \{([\text{inicial}] - [\text{final}]) / [\text{inicial}]\} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde [inicial] = concentração do nutriente no tempo zero e [final] = concentração do nutriente após um período de tempo.

3.4.6. Pigmentos fotossintetizantes

O protocolo de extração e a quantificação de ficobiliproteínas e clorofila *a* foi padronizado para *Gp. tenuifrons*, a partir do método descrito por Kursar *et al.* (1983), segundo modificações descritas no Apêndice II.

Amostras de 120 mg de massa fresca foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido, em penumbra. O material foi suspenso em 4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,5 (81,8% *p/v* $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ e 18,2% *p/v* $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e centrifugado a 20550 rpm e 4 °C por 20 min (Sorvall, RC 5C plus). O sobrenadante foi recolhido e mantido no escuro, a 4 °C, até a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, UV 1650PC), usando uma cubeta de quartzo de percurso óptico de 1 cm. A calibragem e zeragem do equipamento foram feitas com o mesmo tampão fosfato usado na extração. A concentração das ficobiliproteínas foi determinada segundo as fórmulas de Beer & Eshel (1985):

$$\text{FE} = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \cdot 0,20] \cdot 0,12 \quad (6)$$

$$\text{FC} = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) \cdot 0,51] \cdot 0,15 \quad (7)$$

Onde FE = concentração de ficoeritrina, FC = concentração de ficocianina e A_x = absorvância no comprimento de onda x. Os resultados, padronizados pela massa fresca, foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

O material sedimentado na centrifugação do extrato de ficobiliproteínas foi ressuspenso em 3 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) e macerado para a extração da clorofila *a*. Após 3 h no escuro, a 4 °C, o extrato foi centrifugado a 10730 rpm e 4 °C por 15 min (Sorvall, RC 5C plus). O sobrenadante foi recuperado e a concentração de clorofila *a* foi determinada após leitura em espectrofotômetro (Shimadzu, UV 1650PC), usando uma cubeta de quartzo de percurso óptico de 1 cm. A calibragem e zeragem do equipamento foram feitas com o mesmo solvente orgânico usado na extração. A concentração de

clorofila *a* foi determinada de acordo com a fórmula modificada de Inskeep & Bloom (1985):

$$Cl\ a = 12,08 \cdot A_{664,5} \quad (8)$$

Onde $Cl\ a$ = concentração de clorofila *a* e $A_{664,5}$ = absorvância em 664,5 nm. Os resultados, padronizados pela massa fresca, foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

3.4.7. Proteína solúvel total

A análise de proteína solúvel total foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente para ensaio protéico Bio-Rad (Bio-Rad) diluído em água Milli-Q a 25%. Uma alíquota de 10 μL do extrato bruto da NR, sem BSA, ou do extrato de ficobiliproteínas foi adicionada a 900 μL da solução de Bio-Rad e 90 μL de água Milli-Q. A concentração de proteína solúvel total foi, então, determinada espectrofotometricamente (Hewlett Packard, 8452A) pela absorção a 595 nm, usando uma cubeta de polipropileno de percurso óptico de 1 cm. Foi empregado BSA ($1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) como proteína padrão para calibração. Os resultados foram padronizados de acordo com a massa fresca da alga e expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

3.4.8. Rendimento e qualidade dos polissacarídeos.

A extração dos polissacarídeos e as análises de ressonância magnética nuclear de carbono 13 e de prótons foram realizadas no Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, com colaboração do Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, da Profª. Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte e da mestranda Luciana Garcia Ferreira.

3.4.8.1. Extração e rendimento dos polissacarídeos

As amostras secas em estufa a 60 °C foram trituradas em almofariz até a formação de um pó fino. O material moído (1 g) foi submetido a uma extração aquosa (2% *p/v*) sob agitação mecânica por 3 h, a 90 °C. O material foi centrifugado a 8000 rpm e 25 °C por 15 min (Hitachi, CR 21E). O sobrenadante foi recolhido e submetido à diálise em água corrente por 24 h e em água destilada por 4 h (Spectrapor, MCWO 12-14000). Em seguida, o material foi transferido para um balão volumétrico, congelado e, então, liofilizado (Edwards, Modulyo), como mostra a Figura 3.3.

O termo polissacarídeo foi empregado neste trabalho uma vez que o material extraído, provavelmente, não conteria apenas ágar, mas também contaminantes, como

amido das florídeas (Lahaye & Yaphe, 1989; Ursi, 2005). O rendimento de polissacarídeos (Rendimento) foi calculado através da fórmula:

$$\text{Rendimento} = (\text{MS poli}/\text{MS}) \cdot 100 \quad (9)$$

Onde MS poli = massa seca de polissacarídeos e MS = massa seca da alga.



Figura 3.3. Processo de liofilização dos polissacarídeos extraídos de *Gracilariopsis tenuifrons*.

3.4.8.2. Carboidrato total

A quantificação de carboidrato total foi realizada segundo o método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Amostras de 2 mg de polissacarídeo foram diluídas em 1 mL de água Milli-Q. Uma alíquota de 50 μL da solução da amostra foi diluída em 450 μL de água Milli-Q (diluição da amostra). Uma fração de 500 μL da diluição da amostra foi adicionada a 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de H_2SO_4 . Em seguida, o teor de carboidrato foi analisado em espectrofotômetro (GE, Ultrospec 3100 *pro*) a 490 nm, usando uma cubeta de quartzo de percurso óptico de 1 cm e galactose ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) como padrão. Os dados foram expressos em porcentagem, em relação à massa seca dos polissacarídeos.

3.4.8.3. Sulfato

O teor de sulfato foi determinado de acordo com o método de Dogson (1961). Amostras de 4 mg de polissacarídeos foram hidrolisadas em 1,5 mL de HCl 1 N a 105 °C, por 5 h. Uma alíquota de 500 μL de amostra hidrolisada foi acrescentada a 3,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 3% e 1 mL de gelatina-bário (200 mg de gelatina Oxoide dissolvida em 40 mL de água Milli-Q, a 60-70 °C; após 12 h a 4 °C, foi adicionado vagorosamente 200 mg de BaCl_2 ao fluido semigelatinoso; a solução permaneceu a 4 °C por 3 h antes do uso). Após 15 min, as amostras foram analisadas espectrofotometricamente (GE, Ultrospec

3100 *pro*) a 360 nm, usando uma cubeta de quartzo de percurso óptico de 1 cm. Para a confecção da curva padrão foi usado Na₂SO₄ (1 mg.mL⁻¹). Os dados foram expressos em porcentagem, em relação à massa seca dos polissacarídeos.

3.4.8.4. Ressonância magnética nuclear

Primeiramente, foi realizada uma análise de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN-¹³C) para avaliar a estrutura dos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons*. Para tanto, algas mantidas sob as mesmas condições do cultivo estoque (item 3.2) foram trituradas e submetidas a uma extração aquosa (2% *p/v*) sob agitação mecânica por 12 h, a temperatura ambiente. Os demais procedimentos para obtenção dos polissacarídeos seguiram as especificações do item 3.4.8.1. Amostras de 75 mg de polissacarídeo foram dissolvidas em 700 µL de água destilada e água deuterada (D₂O) (1:1). As análises de RMN-¹³C foram realizadas em espectrômetro Bruker, modelo DRX 400, série AVANCE (Figura 3.4), e os espectros foram obtidos na frequência de base de 100,16 MHz, a 70 °C. Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados usando acetona como padrão (30,2 ppm).

Para a análise de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-¹H), amostras de 15 mg de polissacarídeo foram dissolvidas em 500 µL de D₂O e, em seguida, liofilizadas (Edwards, Modulyo). Este procedimento foi repetido três vezes para promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção das moléculas de água presentes, com a finalidade de reduzir o sinal relativo ao hidrogênio ligado ao oxigênio, o qual prejudica a qualidade dos espectros de RMN-¹H. As análises de RMN-¹H foram feitas em espectrômetro Bruker, modelo DRX 400, série AVANCE (Figura 3.4), e os espectros foram obtidos na frequência de base de 400,13 MHz, a 80 °C. Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados empregando acetona como padrão (2,225 ppm). Os picos relativos ao amido das florídeas e à 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose (3,6-AG) e seu precursor foram integrados utilizando-se o programa Topspin 1.3. Padronizou-se o pico referente ao amido como tendo área igual a 1,0 e a área dos demais picos foram calculadas em relação a este. A partir desses dados, foi calculada a razão entre amido e (3,6-AG + precursor) dos polissacarídeos extraídos das algas submetidas às diferentes condições de nitrato.



Figura 3.4. Espectrômetro Bruker, modelo DRX 400, série AVANCE, usado para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H dos polissacarídeos extraídos de *Gracilariopsis tenuifrons*.

3.5. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial. Dados em porcentagem foram submetidos à transformação do tipo arco seno para a realização da análise de variância. Quando a variável foi o tempo, os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas. Testes *a posteriori* de Newman-Keuls foram aplicados de acordo com a significância das análises. Adicionalmente, alguns dados foram submetidos a testes de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas sob um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica v. 6.0, segundo descrições de Zar (1999).

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Crescimento, conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio e atividade *in vitro* da NR

4.1.1. Crescimento

Ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivados em água do mar, VS-N 50% ou VS-N 50% + 50 μM NO_3^- apresentaram-se acentuadamente despigmentados ao término do período experimental, quando comparados aos demais tratamentos (Figura 4.1). Além da maior pigmentação, os ápices cultivados em meio com adição de 150, 250, 500 ou 700 μM de nitrato apresentaram maior comprimento e ramificações esparsas (Figura 4.1).

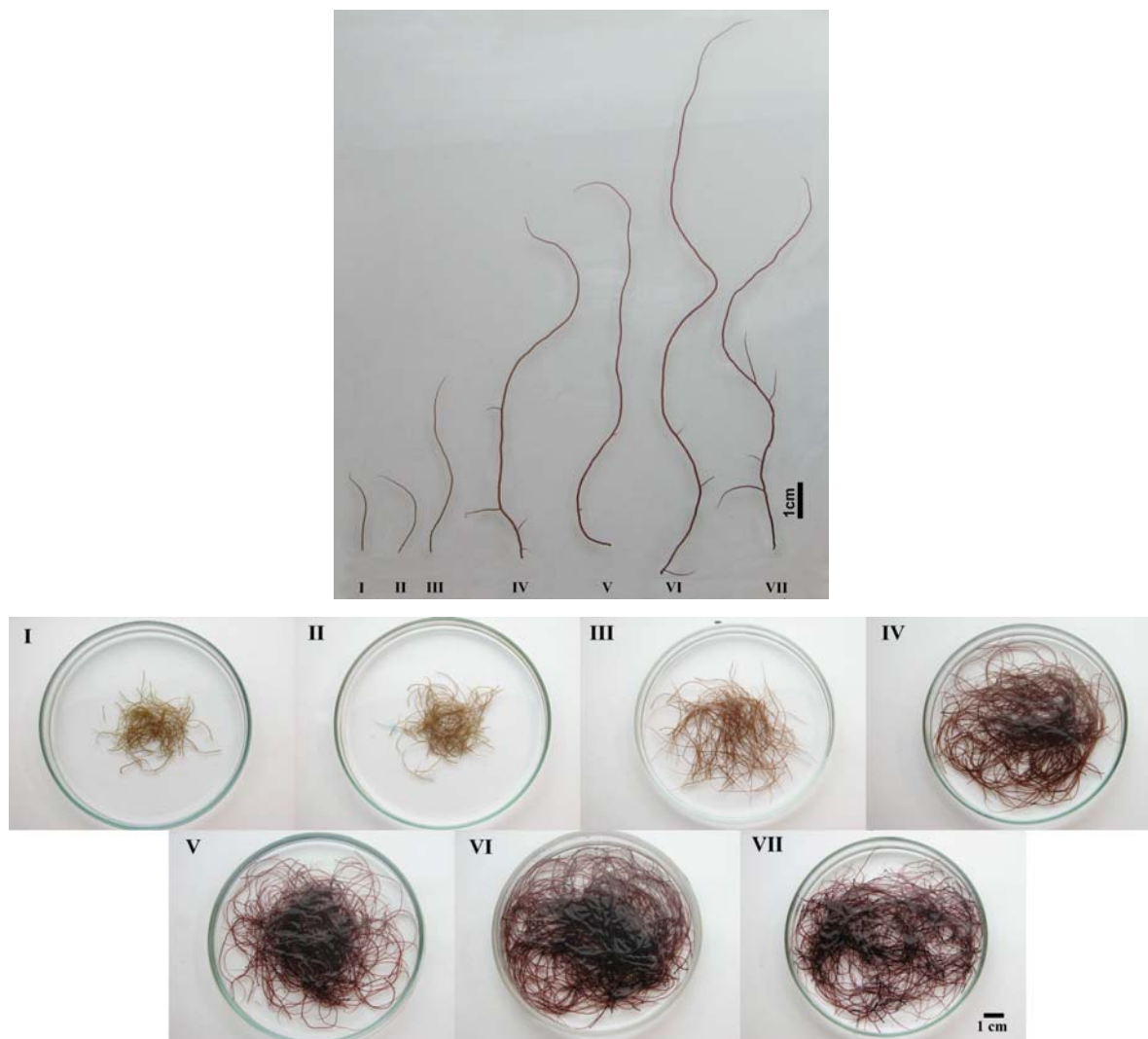


Figura 4.1. Aspecto dos ápices de *Gracilariopsis tenuifrons* após 28 dias de cultivo em diferentes condições de nitrato, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. I = Água do mar, II = VS-N 50%, III = VS-N 50% + 50 μM NO_3^- , IV = VS-N 50% + 150 μM NO_3^- , V = VS-N 50% + 250 μM NO_3^- , VI = VS-N 50% + 500 μM NO_3^- e VII = VS-N 50% + 750 μM NO_3^- .

As taxas de crescimento (TCs) medidas semanalmente mantiveram-se constantes ao longo do período experimental em todos os tratamentos (dados não mostrados). Assim, no cálculo das TCs para comparação entre os tratamentos foram utilizados os valores de massa fresca acumulada durante os 28 dias de experimento.

Ápices de *Gp. tenuifrons* cultivados apenas em água do mar ou VS-N 50% exibiram baixas TCs, próximas a 1 %. d^{-1} (Figura 4.2), não havendo diferença significativa entre elas ($p = 0,6963$). Ápices cultivados em VS-N 50% + 50 $\mu M NO_3^-$ apresentaram TC intermediária, cerca de 3,25 %. d^{-1} (Figura 4.2). Aqueles mantidos em VS-N 50% acrescido de 150, 250, 500 ou 750 μM de nitrato exibiram as maiores TCs, ao redor de 8 %. d^{-1} (Figura 4.2), sendo que não houve diferença significativa entre elas ($p > 0,2360$).

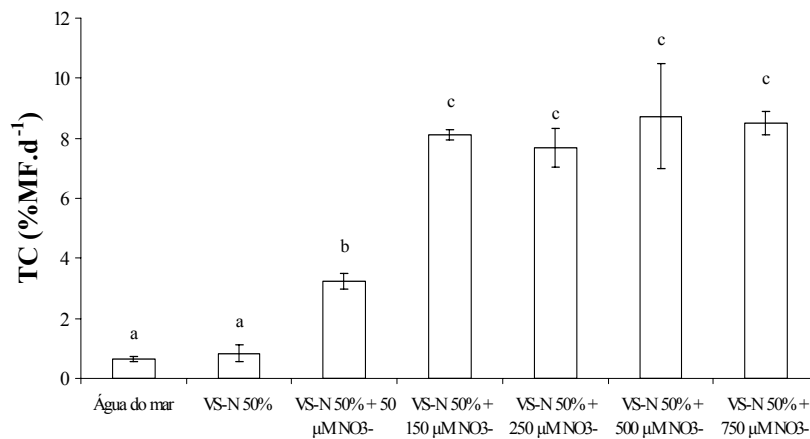


Figura 4.2. Taxa de crescimento (%MF. d^{-1}) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

As algas cultivadas sem adição de nitrato ao meio de cultivo (água do mar ou VS-N 50%) apresentaram sintomas típicos da escassez desse nutriente, amplamente descritos na literatura. Entre os sintomas mais aparentes estão a despigmentação do talo (Figura 4.1), provavelmente resultante da degradação dos pigmentos fotossintetizantes, principalmente ficobiliproteínas, as quais conferem a cor avermelhada às rodófitas, e a redução das TCs (Figura 4.2) (Bird *et al.*, 1982; Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1994; Andria *et al.*, 1999; Costa, 2005). As TCs de *Gp. tenuifrons* mantida em meio sem acréscimo de nitrato foram inferiores às TCs reportadas para *G. birdiae* cultivada sob condições semelhantes, as quais atingiram cerca de 4 %. d^{-1} (Costa, 2005). Apesar das baixas TCs apresentadas por *Gp. tenuifrons* cultivada sem acréscimo de nitrato ao meio (Figura 4.2), elas permaneceram vivas durante todo o período experimental, possivelmente

devido à existência da pequena concentração de fontes de nitrogênio na água do mar empregada nos cultivos ($1,75 \pm 0,28 \mu\text{M}$ de nitrato, $0,19 \pm 0,03 \mu\text{M}$ de nitrito e $0,66 \pm 0,07 \mu\text{M}$ de amônio). Além disso, o período experimental pode não ter sido suficiente para esgotar as reservas internas de nitrogênio das algas, as quais sustentariam o metabolismo da alga durante o período experimental.

As TCs de *Gp. tenuifrons* aumentaram proporcionalmente à adição de nitrato até a concentração de $150 \mu\text{M}$, atingindo um patamar em cerca de $8 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$. Um maior suprimento deste nutriente ($250, 500$ ou $750 \mu\text{M}$) não incrementou significativamente a TC de *Gp. tenuifrons* em relação ao tratamento com adição de $150 \mu\text{M}$ de nitrato (Figura 4.2). Outras Gracilariaceae apresentaram respostas à adição de nitrato diferentes das observadas no presente trabalho. As TCs de *G. tenuistipitata* e *Gracilaria* sp. diminuíram com a maior disponibilidade de nitrato no meio de cultivo. *Gracilaria tenuistipitata* mantida em meio com 100 ou $1000 \mu\text{M}$ de nitrato apresentou TCs próximas a $14,2 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$ e $11,0 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente (García-Sánchez *et al.*, 1993). *Gracilaria* sp. exibiu TC de $6,9 \pm 0,5 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$ e $5,5 \pm 0,4 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$ quando cultivada em meio enriquecido com 15 ou $75 \mu\text{M}$ de nitrato, respectivamente (Navarro-Angulo & Robledo, 1999). *Gracilaria birdiae* cultivada em $62,5, 125, 250$ ou $500 \mu\text{M}$ de nitrato exibiu TCs semelhantes entre si, próximas a $8 \text{ \%} \cdot \text{d}^{-1}$ (Costa, 2005), e similares às observadas para *Gp. tenuifrons* cultivada em meio com adição de $150, 250, 500$ ou $750 \mu\text{M}$ de nitrato.

Esse patamar de crescimento atingido por *Gp. tenuifrons* a partir de $150 \mu\text{M}$ de nitrato poderia indicar a limitação de outro nutriente, como carbono ou fósforo, ou ainda limitação de luz ao crescimento da espécie (García-Sánchez *et al.*, 1993; Navarro-Angulo & Robledo, 1999).

4.1.2. Porcentagem de massa seca e conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio

A porcentagem de massa seca foi superior nos ápices mantidos em água do mar ou VS-N 50%, próxima a 30% (Figura 4.3), porém houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,0051$). As porcentagens caíram gradativamente, de acordo com adição de nitrato, até a concentração de $250 \mu\text{M}$ (Figura 4.3). Ápices cultivados em meio com acréscimo de 50 e $150 \mu\text{M}$ de nitrato apresentaram $21,0 \pm 0,39\%$ e $13,0 \pm 0,35\%$ de massa seca, respectivamente. Nos tratamentos com adição de $250, 500$ ou $750 \mu\text{M}$ de nitrato, *Gp. tenuifrons* apresentou cerca de 12% de massa seca (Figura 4.3), não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,0786$).

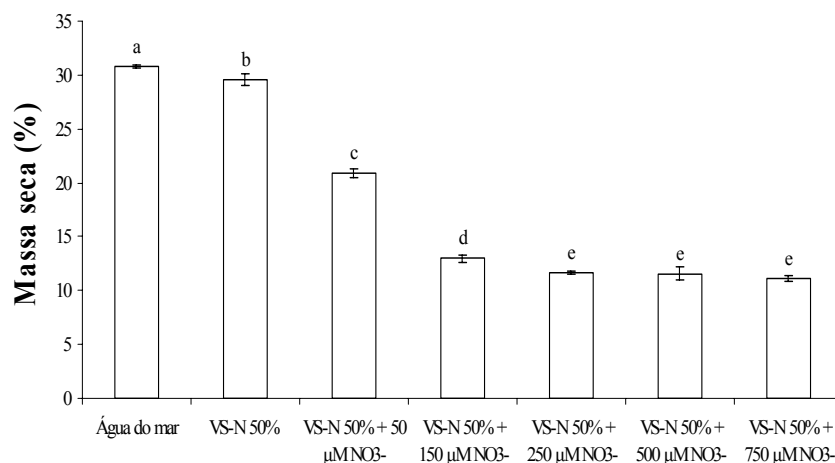


Figura 4.3. Massa seca (%) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).

Apesar da porcentagem de massa seca diminuir com o aumento da disponibilidade de nitrato no meio de cultivo (Figura 4.3), as algas mantidas em meio com maior adição de nitrato apresentaram maior quantidade de massa seca total ao fim do experimento, uma vez que elas apresentaram maiores TCs (Figura 4.2).

As porcentagens de massa seca encontradas podem indicar diferenças na capacidade de armazenamento de substâncias de reserva em *Gp. tenuifrons* quando submetida a diferentes condições de nitrato. Possivelmente, a maior porcentagem de massa seca nas algas submetidas à escassez de nitrato seria devido ao favorecimento da síntese de parede celular e substâncias de reserva, em detrimento da produção de protoplasto (Araño *et al.*, 2000), o que poderia ser evidenciado pelas TCs (Figura 4.2) e conteúdo tecidual de C (Figura 4.4a). Já as altas TCs observadas nas algas submetidas aos tratamentos com maior suprimento de nitrato (Figura 4.2) provavelmente devem-se ao acúmulo intracelular de água, ou seja, ao favorecimento da síntese de protoplasto (Araño *et al.*, 2000; Costa, 2005).

O conteúdo tecidual de carbono e de hidrogênio foi maior em ápices de *Gp. tenuifrons* sob deficiência nutricional, e decresceu com o aumento da disponibilidade de nitrato no meio de cultivo (Figuras 4.4a e 4.4b), seguindo o mesmo padrão encontrado para porcentagem de massa seca (Figura 4.3). O conteúdo de carbono foi superior nas algas mantidas em água do mar ou VS-N 50%, cerca de 345 mg.g⁻¹ (Figura 4.4a), não havendo diferença significativa entre os dois tratamentos (p = 0,0912). Ápices cultivados em meio com acréscimo de 50 e 150 µM de nitrato apresentaram 299,9 ± 5,50 mg.g⁻¹ e 255,9 ± 5,33 mg.g⁻¹ de carbono tecidual, respectivamente. Nos tratamentos com suprimento de 250, 500

ou 750 μM de nitrato, o teor de carbono em *Gp. tenuifrons* esteve ao redor de 245 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 4.4a), sendo que não houve diferença significativa entre eles ($p > 0,4114$).

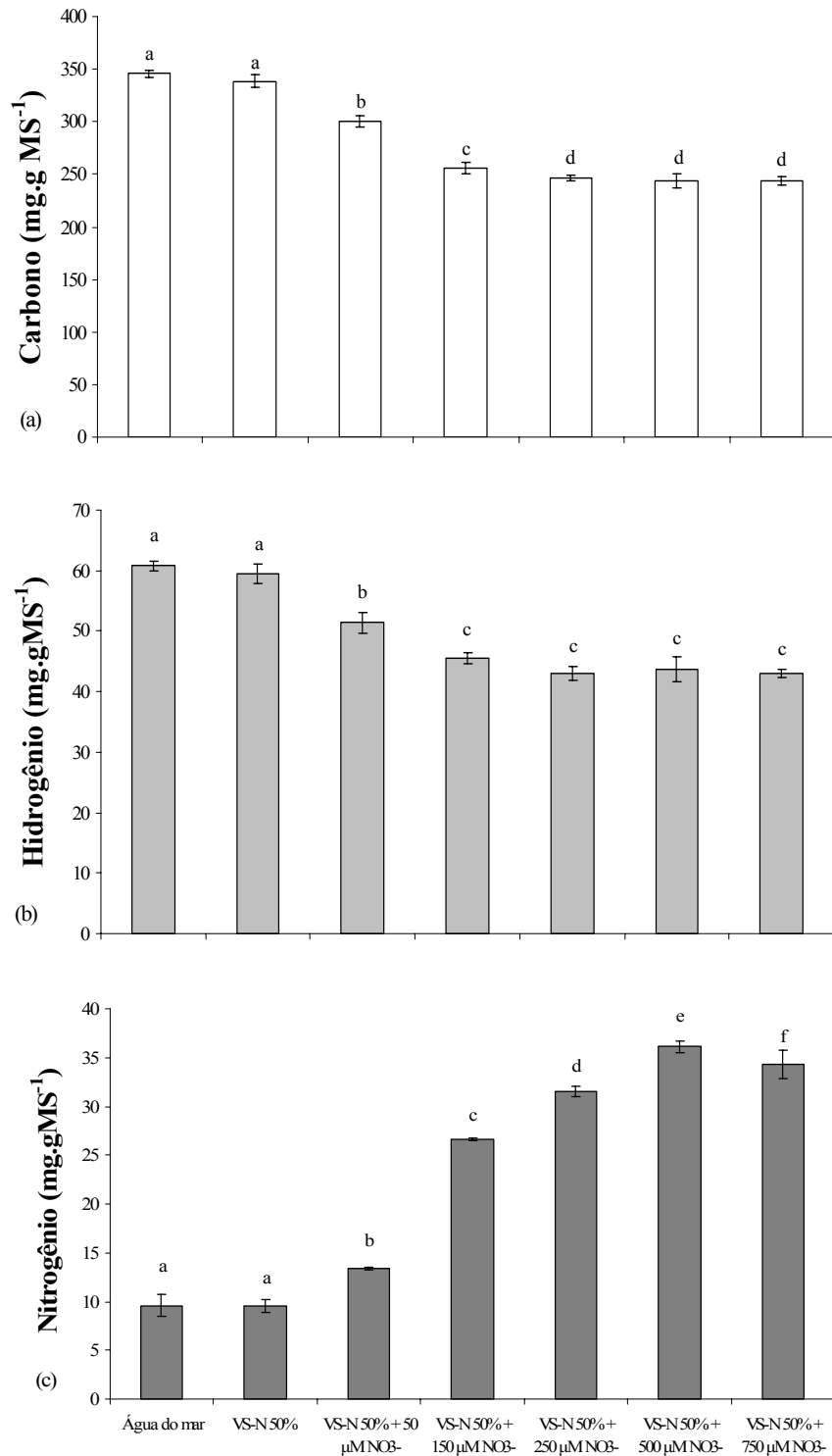


Figura 4.4. Conteúdo tecidual de (a) carbono, (b) hidrogênio e (c) nitrogênio ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Ápices de *Gp. tenuifrons* cultivados apenas em água do mar ou VS-N 50% apresentaram cerca de 60 mg.g⁻¹ de hidrogênio tecidual (Figura 4.4b), não havendo diferença significativa entre estes tratamentos ($p = 0,2026$). O conteúdo tecidual de hidrogênio nas algas mantidas em VS-N 50% + 50 μM NO₃⁻ foi 51,3 ± 1,76 mg.g⁻¹ (Figura 4.4b). Aquelas cultivadas em meio com acréscimo de 150, 250, 500 ou 750 μM de nitrato exibiram os menores teores de hidrogênio, próximos de 45 mg.g⁻¹ (Figura 4.4b), não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,0655$).

O conteúdo tecidual de nitrogênio foi menor em ápices de *Gp. tenuifrons* sob deficiência de nitrato, e aumentou gradualmente à adição de nitrato ao meio de cultivo, exceto para o tratamento com adição de 750 μM de nitrato (Figura 4.4c). As algas cultivadas apenas em água do mar ou VS-N 50% continham cerca de 10 mg.g⁻¹ de nitrogênio tecidual (Figura 4.4c), não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,9777$). Os tratamentos com adição de 50, 150, 250, 500 ou 750 μM de nitrato apresentaram 13,3 ± 0,12 mg.g⁻¹, 26,6 ± 0,09 mg.g⁻¹, 31,5 ± 0,53 mg.g⁻¹, 36,1 ± 0,59 mg.g⁻¹ e 34,3 ± 1,46 mg.g⁻¹ de nitrogênio tecidual, respectivamente (Figura 4.4c).

Os ápices mantidos em água do mar ou VS-N 50% apresentaram razão C:N próxima a 35,5 (Figura 4.5), não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,5011$). As algas cultivadas em VS-N 50% + 50 μM NO₃⁻ apresentaram razão C:N intermediária, aproximadamente 22,5 (Figura 4.5). Os valores da razão C:N nos demais tratamentos foram semelhantes entre si ($p > 0,1204$), variando de 6,8 ± 0,29 a 9,6 ± 0,18 (Figura 4.5).

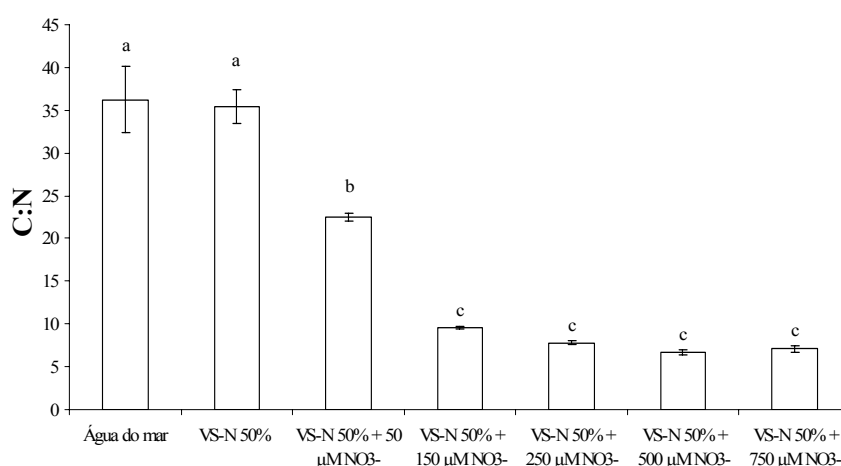


Figura 4.5. Razão C:N de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A TC e a razão C:N de todos os tratamentos foram utilizadas para efetuar-se a correlação entre essas duas variáveis. Foi observada correlação negativa entre os parâmetros ($p = 0,0000$), com um coeficiente de correlação de Pearson (r) de $-0,9755$ para o conjunto de dados (Figura 4.6).

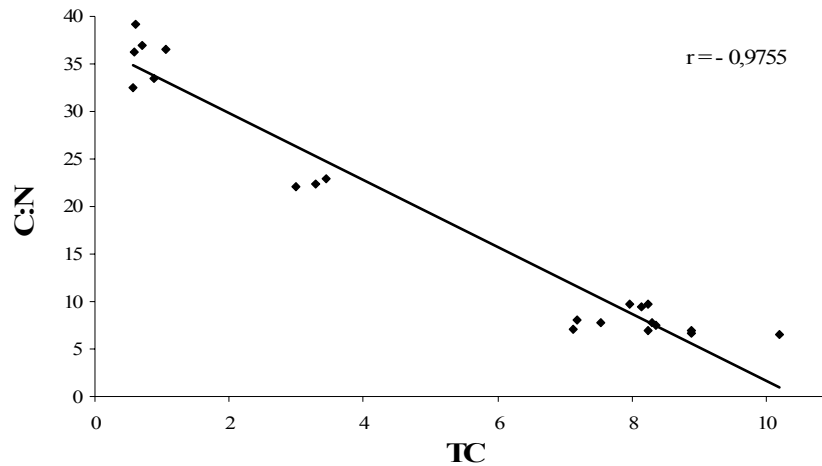


Figura 4.6. Correlação entre razão C:N e taxa de crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

O conteúdo tecidual de carbono, hidrogênio e nitrogênio está intimamente relacionado ao estado nutricional das macroalgas marinhas (Lapointe, 1981; Lapointe & Duke, 1984; Hwang *et al.*, 1987; Andria *et al.*, 1999; Costa, 2005).

O maior conteúdo de carbono observado em *Gp. tenuifrons* cultivada em meio sem adição de nitrato (Figura 4.4a) está de acordo com o reportado para outras Gracilariaceae mantidas sob limitação de nitrogênio (Lapointe & Duke, 1984; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999, Costa 2005). Isto pode estar relacionado ao acúmulo de amido das florídeas e floridosídeo, considerados reservas dinâmicas de carbono em algas vermelhas, como verificado em *G. tenuistipitata* (Collén *et al.*, 2004). A diminuição do conteúdo de carbono em condições de maior disponibilidade de nitrato (Figura 4.4a) provavelmente ocorreu em resposta à assimilação de nitrato, que estimularia o fluxo de carbono através das rotas glicolíticas e respiratórias, evitando seu acúmulo como fontes de reserva dinâmica (Turpin *et al.*, 1988; García-Sánchez *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1995).

O baixo conteúdo de nitrogênio encontrado nas algas cultivadas apenas em água do mar, VS-N 50% ou VS-N 50% + 50 μM NO_3^- (Figura 4.4c) possivelmente deveu-se ao consumo das reservas intracelulares deste composto, entre elas, pigmentos

fotossintetizantes, o que pode ser evidenciado pelo aspecto pálido das algas mantidas nessas condições (Figura 4.1) (Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1993; Andria *et al.*, 1999; Costa, 2005). O teor de nitrogênio tecidual de *Gp. tenuifrons* aumentou conforme a adição de nitrato ao meio de cultivo, provavelmente pelo acúmulo de substâncias nitrogenadas, como pigmentos, proteínas solúveis e aminoácidos livres, que serviriam como fontes dinâmicas de nitrogênio para a alga (Bird *et al.*, 1981; García-Sánchez *et al.*, 1993; Andria *et al.*, 1999; Naldi & Wheeler, 1999; Costa, 2005). As algas submetidas ao tratamento com acréscimo de 750 μM de nitrato apresentaram conteúdo de nitrogênio inferior ao das algas cultivadas em meio com 500 μM de nitrato. Isto pode ter ocorrido devido à liberação de compostos nitrogenados pelas algas, por exemplo, nitrogênio orgânico dissolvido (NOD), com observado em *Ulva lactuca* (Tyler *et al.*, 2001) e em *Hypnea musciformis* cultivada em meio com acréscimo de 80 ou 100 μM de nitrato (Martins, 2007), sendo que as substâncias liberadas pelas macroalgas podem ser aminoácidos livres (Naldi & Wheeler, 2002) ou peptídeos (Tyler *et al.*, 2003).

A razão C:N é um parâmetro associado à nutrição em longo prazo e usado em modelos de produtividade primária (Geider & La Roche, 2002; Barr & Rees, 2003). A razão de Redfield, que define uma relação fixa C:N para o plâncton marinho de 106:16 (aproximadamente 6,06), tem sido contestada por diversos trabalhos, os quais afirmam que a razão C:N varia de acordo com a espécie e com as condições nutricionais a que os organismos estão submetidos (Geider & La Roche, 2002; Ho *et al.*, 2003).

A razão C:N de *Gp. tenuifrons* variou de acordo com a disponibilidade de nitrato no meio de cultivo, sendo que uma elevada razão C:N estava relacionada aos tratamentos com limitação de nitrato (Figura 4.5). Ao contrário, uma maior disponibilidade de nitrato refletiu em uma menor razão C:N (Figura 4.5). Este fato tem sido reportado para outras algas (Hanisak, 1990; García-Sánchez *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999; Geider & La Roche, 2002). Em *Gracilaria* sp., *G. tikvahiae* e *Gracilariopsis lemaneiformis*, a razão C:N variou apenas de acordo com o conteúdo tecidual de nitrogênio (Hanisak, 1990; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999). Porém, em *Gp. tenuifrons*, a razão C:N variou em função dos teores teciduais de carbono e nitrogênio (Figuras 4.4a, 4.4b e 4.5).

A TC e a razão C:N apresentaram uma correlação negativa (Figura 4.6), sendo que ambas as variáveis atingiram um patamar a partir do tratamento com adição de 150 μM de nitrato ao meio de cultivo (Figuras 4.2 e 4.6). O crescimento, portanto, refletiria o balanço

entre o metabolismo de carbono e nitrogênio, enquanto que a razão C:N seria um bom indicador do estado nutricional de *Gp. tenuifrons* (Barr & Rees, 2003).

4.1.3. Atividade *in vitro* da NR

Ápices de *Gp. tenuifrons* mantidos em água do mar ou VS-N 50% exibiram baixa atividade da NR, variando de $20 \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$ a $30 \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$ (Figura 4.7a), sendo que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,6919$). A maior atividade da NR, cerca de $90 \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$, foi verificada no tratamento com adição de $50 \mu\text{M}$ de nitrato. O tratamento com suprimento de $150 \mu\text{M}$ de nitrato apresentou alta atividade da NR, porém inferior a do tratamento com $50 \mu\text{M}$ de nitrato ($p = 0,0019$) (Figura 4.7a). Os tratamentos com acréscimo de 250, 500 ou $750 \mu\text{M}$ de nitrato apresentaram valores reduzidos de atividade da NR (Figura 4.7a), semelhantes entre si e aos tratamentos sem adição de nitrato ($p > 0,1548$).

A atividade específica da NR apresentou padrão semelhante à atividade da NR (Figura 4.7b). *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada apenas em água do mar apresentou atividade específica da NR inferior ao do tratamento com VS-N 50% ($p = 0,0093$). A maior atividade específica da enzima também foi observada no tratamento com adição de $50 \mu\text{M}$ de nitrato, seguida do tratamento com acréscimo de $150 \mu\text{M}$ de nitrato (Figura 4.7b). Os tratamentos com adição de 250, 500 ou $750 \mu\text{M}$ de nitrato apresentaram os menores valores de atividade específica da NR (Figura 4.7b), sendo que não houve diferença significativa entre eles ($p > 0,1731$). Porém, houve diferença entre estes tratamentos e aqueles em que as algas foram mantidas em água do mar ou em VS-N 50% ($p < 0,0001$). Essa diferença provavelmente deveu-se ao maior conteúdo de proteína solúvel total verificado nos tratamentos com maior suprimento de nitrato (Figura 4.8).

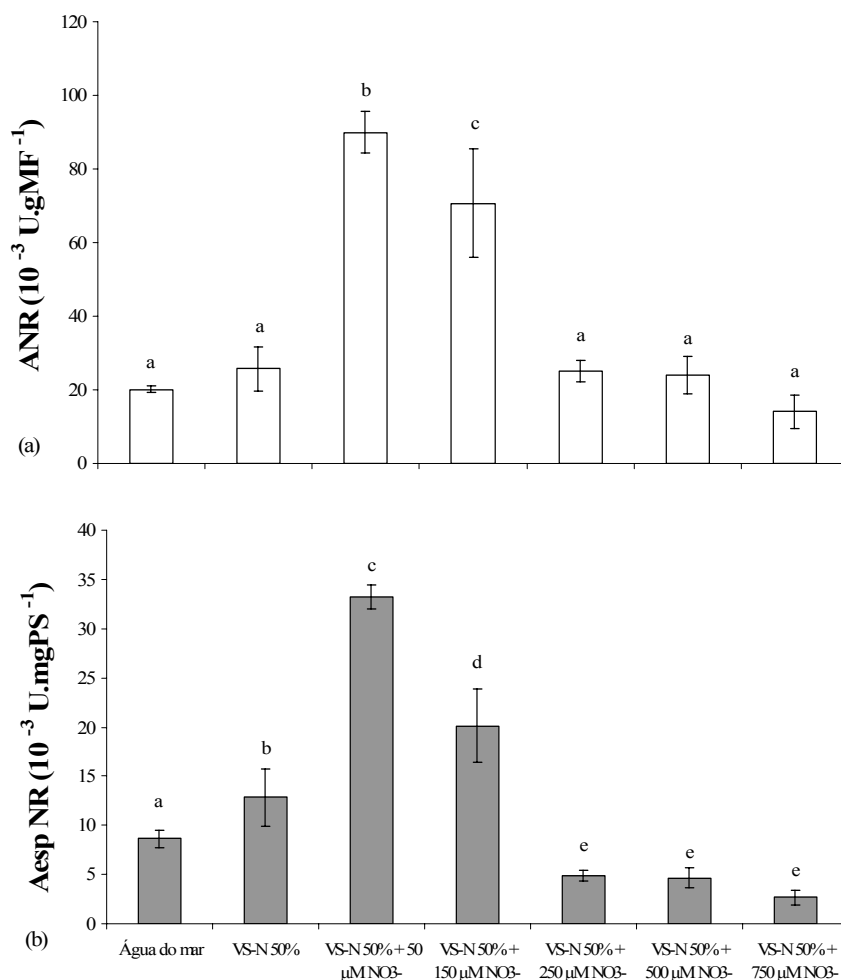


Figura 4.7. (a) Atividade *in vitro* da NR (10^{-3} U.gMF⁻¹) e (b) atividade específica da NR (10^{-3} U.mgPS⁻¹) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).

A concentração de proteína solúvel total foi menor nas algas sob deficiência de nitrato, e aumentou gradualmente à adição de nitrato ao meio de cultivo (Figura 4.8). As algas cultivadas apenas em água do mar apresentaram cerca de 2300 µg.g⁻¹ de proteína solúvel, sendo que este valor foi semelhante aos encontrados para os tratamentos VS-N 50% (p = 0,0902) e VS-N 50% + 50 µM NO₃⁻ (p = 0,0841) (Figura 4.8). O tratamento com adição de 150, 250, 500 ou 750 µM de nitrato apresentaram 3521 ± 347 µg.g⁻¹, 4720 ± 365 µg.g⁻¹, 5129 ± 20 µg.g⁻¹ e 5240 ± 390 µg.g⁻¹ de proteína solúvel, respectivamente (Figura 4.8), sendo que o tratamento com 500 µM de nitrato foi semelhante aos com adição de 250 e 750 µM de nitrato (p > 0,0542). Os dados de proteína solúvel são discutidos no item 4.3.2, que trata das reservas intracelulares de nitrogênio.

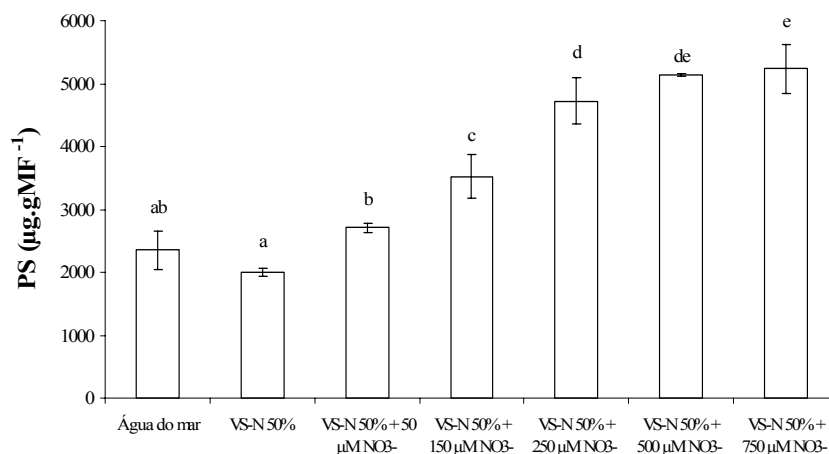


Figura 4.8. Concentração de proteína solúvel total ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A disponibilidade de nitrato é um dos principais fatores reguladores da atividade da NR para a maioria das espécies de algas estudadas (Lopes, 2001; Lartigue & Sherman, 2005; Chow *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2007; Chow & Oliveira, 2008). O nitrato captado pelas células, mas não imediatamente assimilado, fica estocado nos vacúolos, onde pode permanecer até que o nitrato no meio externo se esgote (Crawford, 1995), sendo posteriormente disponibilizado segundo os requerimentos metabólicos do organismo. Devido à capacidade das algas de acumular nitrato, a atividade da NR pode manter-se durante alguns dias mesmo que o suprimento externo de nitrato esteja esgotado e, na medida em que o nitrato é assimilado, a atividade da NR diminui (Chow, 2002; Chow & Oliveira, 2008).

A baixa atividade da NR apresentada por *Gp. tenuifrons* cultivada em água do mar ou VS-N 50% (Figura 4.7) provavelmente está relacionada à carência de nitrato no meio externo e no estoque intracelular das algas. Isto poderia indicar que o nitrato é requerido para a síntese da NR, para proteger a enzima dos processos de degradação (Solomonson & Barber, 1990; Crawford & Arst, 1993; Berges, 1997; Kaiser & Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004) e/ou induzir sua atividade. Além disso, as algas cultivadas em água do mar ou VS-N 50% apresentaram valores de atividade da NR semelhantes, indicando que os nutrientes presentes na solução VS-N não influenciariam a atividade da enzima.

Gracilariopsis tenuifrons cultivada em meio com adição de 50 μM de nitrato apresentou a maior atividade da NR, seguida pelo tratamento com acréscimo de 150 μM . Os tratamentos com suprimento de 250, 500 ou 750 μM de nitrato exibiram baixa atividade

da NR, semelhante à verificada nos tratamentos com água do mar e VS-N 50% (Figura 4.7a). Estes resultados não são condizentes com os dados de crescimento (Figura 4.2), de nitrogênio tecidual (Figura 4.4c) e de proteína solúvel (Figura 4.8), os quais refletiriam o metabolismo de nitrogênio.

Apesar de o nitrato ser um importante sinal para a indução da atividade da NR, outros fatores também influenciam a atividade da enzima, como metabólitos nitrogenados e condições de luminosidade (Solomonson & Barber, 1990; Crawford & Arst, 1993; Granbom *et al.*, 2004). O acúmulo de substâncias nitrogenadas (por exemplo, aminoácidos livres) pelas algas submetidas aos tratamentos com maior disponibilidade de nitrato poderia desencadear um mecanismo de *feedback* negativo sobre a atividade da NR, fazendo com que as algas apresentassem uma baixa atividade enzimática, como observado nos tratamentos com adição de 250, 500 ou 750 μM de nitrato (Figura 4.7).

Além disso, acredita-se que a atividade da NR esteja acoplada à fotossíntese, uma vez que esta fornece esqueletos carbônicos, ATP e compostos redutores (NAD(P)H e Fd-red), necessários à assimilação do nitrato. Dessa forma, evitar-se-ia o acúmulo intracelular de nitrito e amônio, intermediários tóxicos da via de redução do nitrato (Turpin, 1991; Crawford & Arst, 1993). É provável que a irradiância usada nos experimentos ($65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) tenha sido limitante para os tratamentos com maior disponibilidade de nitrato. Assim, uma redução na atividade da NR evitaria o acúmulo de nitrito e amônio, uma vez não haveria uma correspondente produção dos compostos providos pela fotossíntese e requeridos para a assimilação de nitrato. Possivelmente, uma maior assimilação de nitrato poderia ser estimulada induzindo-se a fotossíntese mediante o aumento da irradiância.

A atividade da NR de gametófitos de *Gracilaria domingensis* foi maior nos tratamentos com 65 ou 127 μM de nitrato, quando comparada aos tratamentos com 252 ou 502 μM de nitrato (Ferreira, 2008). A autora, porém, atribuiu esses resultados a um mecanismo de *feedback* negativo do substrato sobre a atividade da NR, sendo que essa resposta estaria relacionada ao fato de a alga ser oriunda de águas oligotróficas e, portanto, sensível a altas concentrações de nutrientes.

Como a NR é uma enzima substrato-induzível (Solomonson & Barber, 1990; Crawford & Arst, 1993; Tischner, 2000), seria mais plausível considerar que a baixa atividade da NR de *Gp. tenuifrons* verificada nos tratamentos com maior suprimento de nitrato deveu-se a um mecanismo de *feedback* negativo provocado pelo acúmulo intracelular de compostos nitrogenados, os quais poderiam ser deslocados para outras rotas

metabólicas na presença de uma maior quantidade de esqueletos carbônicos, advindos da fotossíntese. Assim, acredita-se que a NR estaria presente nas algas cultivadas em meio com maior adição de nitrato, uma vez que este composto é requerido para a síntese da enzima (Crawford, 1995), porém a NR estaria majoritariamente na forma inativa devido ao mecanismo de *feedback* negativo. A inativação da enzima dar-se-ia principalmente por regulação pós-traducional, através da fosforilação da enzima. A atividade da enzima fosforilada não seria detectada, pois apenas a NR desfosforilada fica ativa em ensaios enzimáticos com Mg^{2+} (Lillo *et al.*, 2004). Portanto, seria interessante avaliar a influência de uma maior irradiância ou do acréscimo de uma fonte de carbono ao meio de cultivo sobre a atividade *in vitro* da NR.

Os resultados de atividade *in vitro* da NR (Figura 4.7a) e atividade específica da enzima (Figura 4.7b) mostraram-se em desacordo com os dados de TC (Figura 4.2) e razão C:N (Figura 4.5). Portanto, ao contrário do sugerido por alguns autores (Davison & Stewart, 1984; Thomas & Harrison, 1988), a atividade da NR não seria adequada para ser usada como indicador de estado nutricional de *Gp. tenuifrons*. A atividade da NR, então, seria um parâmetro relacionado à interação dos metabolismos de carbono e nitrogênio em um determinado tempo e poderia fornecer indícios de seus mecanismos de regulação.

Uma vez que: i) as algas cultivadas em água do mar ou VS-N 50% apresentaram resultados semelhantes para todos os parâmetros analisados, exceto atividade específica da NR, ii) as algas mantidas em meio com adição de 50 μM apresentaram respostas distintas dos demais tratamentos para todos os parâmetros analisados, iii) as algas cultivadas em meio com suprimento de 150 ou 250 μM de nitrato exibiram diferenças quanto ao conteúdo tecidual de carbono, atividade da NR e atividade específica da NR e iv) os tratamentos com acréscimo de 250, 500 ou 750 μM de nitrato exibiram respostas semelhantes para todos os parâmetros avaliados, os tratamentos VS-N 50%, VS-N 50% + 50 $\mu M NO_3^-$, VS-N 50% + 150 $\mu M NO_3^-$ e VS-N 50% + 250 $\mu M NO_3^-$ foram selecionados para avaliar a captação de nitrato e fosfato, determinar o conteúdo das reservas intracelulares de nitrogênio (ficobiliproteínas, clorofila *a* e proteína solúvel total) e avaliar o rendimento e a qualidade dos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons*. Além disso, o tratamento VS-N 50% + 250 $\mu M NO_3^-$ foi escolhido para analisar a atividade *in vitro* da NR frente ao aumento da irradiância ou suprimento de uma fonte de carbono.

4.2. Atividade da NR frente ao aumento de irradiância ou ao suprimento de uma fonte de carbono

No experimento anterior, foi avaliada a atividade da NR de *Gp. tenuifrons* cultivada em meio com adição de diferentes concentrações de nitrato, sendo que os tratamentos com acréscimo de 250, 500 ou 750 μM de nitrato apresentaram baixa atividade enzimática (Figura 4.7a). Considerou-se plausível a hipótese de que a NR estaria presente nas algas cultivadas em meio com maior adição de nitrato, uma vez que este nutriente é necessário para a síntese da enzima (Solomonson & Barber, 1990; Crawford & Arst, 1993; Tischner, 2000). Porém, ao menos nas 24 h subseqüentes à renovação do meio de cultivo, a NR estaria majoritariamente na forma inativa devido ao mecanismo de *feedback* negativo provocado pelo acúmulo intracelular de compostos nitrogenados. A inativação da enzima dar-se-ia principalmente por regulação pós-traducional, através da fosforilação da NR e, dessa forma, sua atividade não seria detectada, visto que apenas a NR desfosforilada permanece ativa em ensaios enzimáticos com Mg^{2+} (Lillo *et al.*, 2004).

Os compostos nitrogenados, como aminoácidos, poderiam ser deslocados para outras rotas metabólicas na presença de uma maior quantidade de esqueletos carbônicos, oriundos do processo fotossintetizante ou de fontes externas de carbono. Conseqüentemente, poderia haver um incremento da atividade da NR.

Para testar esta hipótese, a atividade da NR e a porcentagem de remoção de nitrato foram avaliadas frente ao aumento de irradiância ou ao acréscimo de uma fonte de carbono. *Gracilariopsis tenuifrons* foi cultivada em VS-N 50% + 250 μM NO_3^- , seguindo as mesmas condições do experimento anterior. Ao término do período de cultivo, as algas foram mantidas em VS-N 50% + 250 μM NO_3^- por 24 h. Dentro das duas horas subseqüentes, período de máxima atividade da enzima (ente 4 e 6 h após o início do fotoperíodo), alíquotas de 70 mg de massa fresca foram incubadas em 70 mL do mesmo meio de cultivo por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min, em três diferentes condições: i) sob $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) sob $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) sob $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} + 0,3 \text{ M glicerol}$.

A atividade *in vitro* da NR de *Gp. tenuifrons* na condição controle manteve-se estável ao longo do experimento (Figura 4.9). Aos 5, 10, 15, 30, 60 e 90 min, os valores de atividade enzimática foram semelhantes entre si ($p > 0,5428$). A atividade da NR foi maior aos 120 min, porém semelhante à atividade em 15 e 30 min ($p > 0,0619$). A atividade da NR no controle foi superior à observada no experimento anterior, nas algas também cultivadas em meio com acréscimo de 250 μM de nitrato (Figura 4.7a). Possivelmente, isto

ocorreu devido à diferença de idade das algas (Harrison *et al.*, 1986), uma vez que as demais condições de experimentação foram as mesmas. A diferença de idade poderia traduzir-se em diferenças no estado fisiológico entre as algas utilizadas no experimento anterior, cujo cultivo foi realizado de 24 de janeiro de 2007 a 14 de março de 2007 (pré-tratamento e período experimental), e aquelas usadas neste experimento, realizado 12 meses depois.

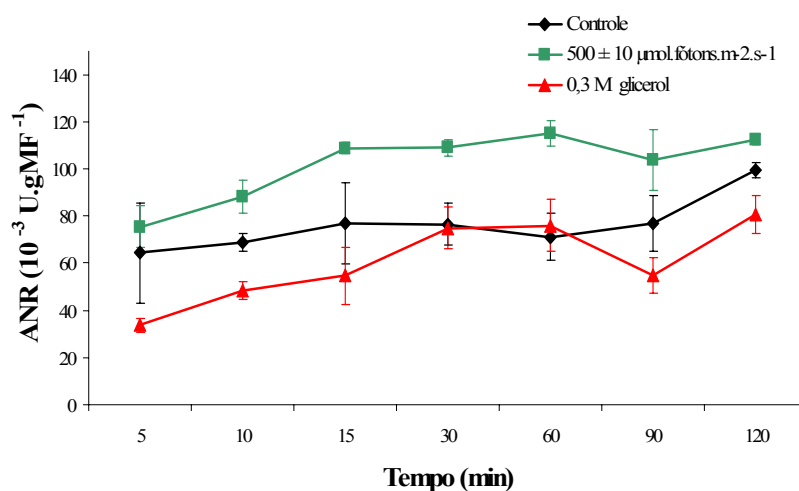


Figura 4.9. Atividade *in vitro* da NR (U.gMF⁻¹) de *Gracilariopsis tenuifrons*, cultivada em VS-N 50% + 250 μM NO₃⁻ por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, submetida a três tratamentos: i) 65 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ (controle), ii) 500 ± 10 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ ou iii) 65 ± 5 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ + 0,3 M glicerol, por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança.

Sob 500 ± 10 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹, foi observado um aumento da atividade da NR ao longo do tempo, até os 15 min. A partir daí, a atividade enzimática manteve-se constante (p > 0,1991) (Figura 4.9). A atividade da NR também oscilou ao longo do tempo com o suprimento de 0,3 M glicerol (Figura 4.9), sendo que o valor mais baixo foi registrado aos 5 min. Os valores foram semelhantes entre si aos 10, 15 e 90 min (p > 0,3106) e aos 30, 60 e 120 min (p > 0,4431), sendo estes últimos maiores.

Aos 5 min, as atividades da NR no controle e no tratamento com 500 ± 10 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ foram semelhantes entre si (p = 0,2702) e superiores a do tratamento com suprimento de 0,3 M glicerol (p < 0,0167). Passados 10 min ou 15 min, a atividade da NR sob 500 ± 10 μmol de fótons.m⁻².s⁻¹ foi maior que a do controle (p < 0,0116) e do tratamento com adição da fonte de carbono (p < 0,0023). Este, por sua vez, apresentou atividade enzimática inferior à do controle (p < 0,0477). Aos 30 ou 60 min, os valores de atividade da NR no controle e no tratamento com suprimento de fonte de carbono foram

semelhantes entre si ($p > 0,4893$) e inferiores ao tratamento com $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($p < 0,0019$). Aos 90 ou 120 min, a atividade da NR também diferiu entre os três tratamentos, sendo que o tratamento com 0,3 M glicerol apresentou a menor atividade. No controle, a atividade da NR foi maior que no tratamento com acréscimo de fonte de carbono ($p < 0,0332$) e inferior a do tratamento com maior irradiância ($p < 0,0154$).

Considerando-se todo o período de experimento, o valor médio de atividade *in vitro* da NR no controle foi $(76,3 \pm 4,42) \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$, sob $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi $(101,8 \pm 2,43) \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$ e com acréscimo de 0,3 M glicerol foi $(60,5 \pm 2,38) \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$, sendo que houve diferença significativa entre os três tratamentos ($p = 0,0000$)

A atividade específica da NR de *Gp. tenuifrons* no controle manteve-se constante ao longo do tempo ($p = 0,1690$) (Figura 4.10). Como a atividade *in vitro* foi superior a do experimento anterior (Figuras 4.7a e 4.9) e quantidade de proteína solúvel foi semelhante (Figuras 4.8 e 4.11), a atividade específica da NR no controle também foi superior à observada no primeiro experimento (Figuras 4.7b e 4.10).

Sob $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a atividade específica da NR manteve-se relativamente estável, havendo diferença apenas entre 5 e 15 min ($p = 0,0205$) e entre 5 e 90 min ($p = 0,0368$) (Figura 4.10). A atividade específica da NR oscilou ao longo do experimento com a adição de 0,3 M glicerol (Figura 4.10), sendo que os valores foram semelhantes entre si aos 5, 10 e 90 min ($p > 0,0600$), aos 10, 15 e 90 min ($p > 0,4865$) e aos 15, 30, 60 e 120 min ($p > 0,4865$).

Tendo em vista todo o período experimental, os valores médios de atividade específica da NR no controle, sob $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e no tratamento com adição de 0,3 M glicerol foram $(17,6 \pm 1,28) \cdot 10^{-3} \text{ U.mg}^{-1}$, $(20,8 \pm 0,79) \cdot 10^{-3} \text{ U.mg}^{-1}$ e $(16,8 \pm 0,75) \cdot 10^{-3} \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente, sendo que os valores de atividade específica da NR no controle e no tratamento com acréscimo de fonte de carbono foram semelhantes entre si ($p = 0,4434$) e distintos do valor encontrado no tratamento sob maior irradiância ($p < 0,0023$).

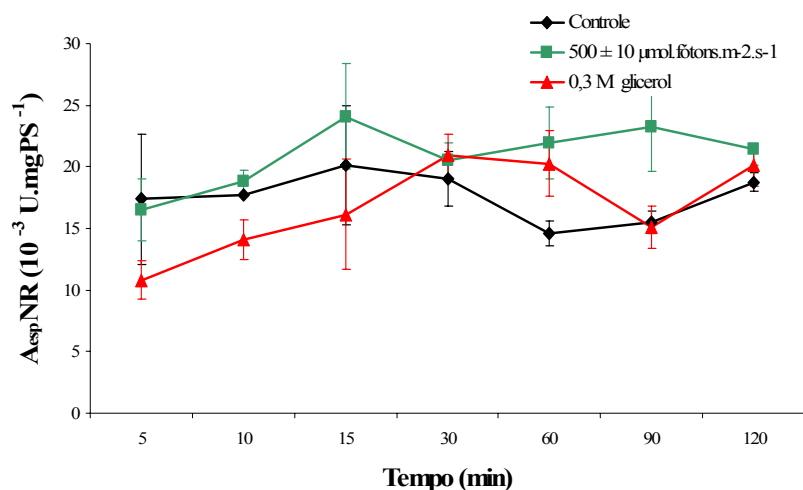


Figura 4.10. Atividade específica da NR (U.mgPS^{-1}) de *Gracilariopsis tenuifrons*, cultivada em VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, submetida a três tratamentos: i) $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} + 0,3 \text{ M glicerol}$, por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min ($n=3$). Barras indicam intervalo de confiança.

Na condição controle, a concentração de proteína solúvel total manteve-se constante até os 30 min ($p > 0,4751$). A partir daí, houve um aumento na concentração de proteínas, a qual permaneceu estável até os 120 min ($p > 0,2599$). No tratamento com maior irradiância, o teor de proteínas permaneceu constante ao longo do experimento ($p > 0,4659$). No tratamento com adição de 0,3 M glicerol, a concentração de proteínas foi semelhante aos 5, 10, 15, 30, 60 e 90 min ($p > 0,1560$) e aos 30, 60, 90 e 120 min ($p > 0,0882$) (Figura 4.11).

Considerando-se todo o tempo de experimento, o valor médio de proteína solúvel total no controle, sob $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e no tratamento com adição de 0,3 M glicerol foi $4336 \pm 109 \mu\text{g.g}^{-1}$, $4852 \pm 21 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $3590 \pm 71 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Houve diferença significativa entre os três tratamentos ($p = 0,0000$)

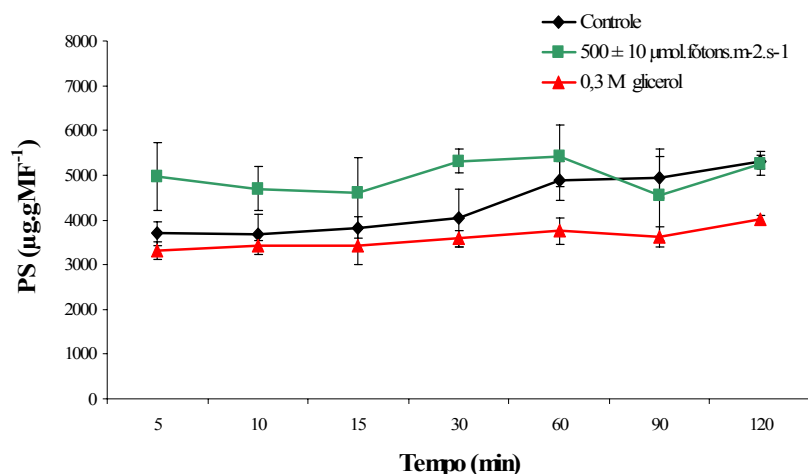


Figura 4.11. Concentração de proteína solúvel total ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*, cultivada em VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, submetida a três tratamentos: i) $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} + 0,3 \text{ M glicerol}$, por 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança.

A concentração de nitrato no meio de cultivo antes do experimento era de $246,7 \pm 1,32 \mu\text{M}$. A porcentagem de remoção de nitrato manteve-se constante ao longo dos 120 min de experimento no controle ($p = 0,0659$) e no tratamento com maior irradiância ($p = 0,5187$) (Figura 4.12). No tratamento com adição de 0,3 M glicerol, a remoção de nitrato permaneceu constante até os 90 min ($p > 0,0620$), sendo que aos 120 min houve uma redução da remoção ($p < 0,0018$) (Figura 4.12).

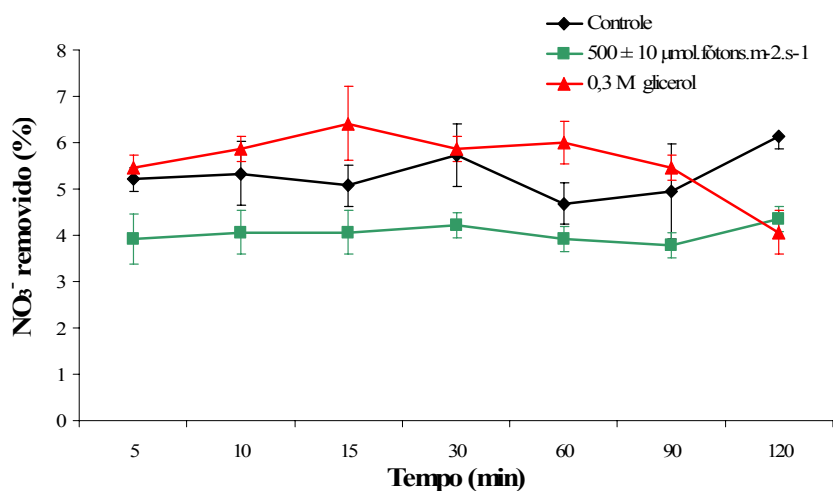


Figura 4.12. Nitrato removido (%) do meio de cultivo, após 5, 10, 15, 30, 60, 90 ou 120 min, por *Gracilariopsis tenuifrons* submetida a três tratamentos i) $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (controle), ii) $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ou iii) $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1} + 0,3 \text{ M glicerol}$ ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança.

Considerando-se os 120 min de experimento, o valor médio de remoção de nitrato no controle foi $5,3 \pm 0,37\%$, sob $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi $4,05 \pm 0,14\%$ e com acréscimo de 0,3 M glicerol foi $5,6 \pm 0,55\%$. A porcentagem de remoção de nitrato no controle e do tratamento com acréscimo de fonte de carbono foram semelhantes entre si ($p = 0,1334$) e inferiores à porcentagem removida no tratamento sob maior irradiância ($p < 0,0002$).

Esperava-se que o aumento de irradiância ou o suprimento de uma fonte de carbono desencadeassem um efeito semelhante sobre a atividade da NR e a porcentagem de remoção de nitrato do meio de cultivo, visto que a elevação de irradiância poderia fornecer maior quantidade de esqueletos carbônicos, através da fotossíntese. Isto, porém, não foi observado.

A atividade *in vitro* e a específica da NR de *Gp. tenuifrons* submetida a $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram superiores às do controle (Figuras 4.9 e 4.10), sendo que o aumento da atividade enzimática foi observado aos 10 min de experimento. Isto indicaria que a NR estaria presente nas algas cultivadas em meio com adição de $250 \mu\text{M}$ de nitrato, porém, principalmente na forma inativa, pelo menos nas 24 h após a renovação do meio de cultivo. O rápido incremento da atividade enzimática sugere que a regulação da NR, neste caso, seria pós-traducional, visto que a síntese da enzima requer algumas horas (Deng *et al.*, 1990; Lillo, 1994). A modulação pós-traducional possivelmente envolveria a desfosforilação da enzima, uma vez que apenas NR desfosforilada permanece ativa em ensaios com Mg^{2+} , como os realizados no presente trabalho (Kaiser & Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004).

Nas algas tratadas com $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ também foi verificado um aumento na concentração de proteínas solúveis em relação ao controle (Figura 4.11). O aumento de irradiância poderia ter estimulado a fotossíntese, a qual provê esqueletos carbônicos, ATP e compostos redutores (NAD(P)H e Fd-red), necessários à assimilação do nitrato (Turpin, 1991; Crawford & Arst, 1993). Dessa forma, os compostos nitrogenados acumulados, como aminoácidos livres, que desencadeariam o mecanismo de *feedback* negativo sobre a NR, seriam deslocados para a síntese de proteínas e a atividade da NR aumentaria.

O estado redox do estoque da plastoquinona também pode estar relacionado à elevação da atividade da NR observado no tratamento com $500 \pm 10 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O aumento da irradiância poderia ter ocasionado a redução desse estoque, estimulando a

atividade da NR. Porém, as vias de sinalização envolvidas neste processo não são totalmente compreendidas (Giordano *et al.*, 2005).

Esperava-se que a adição de 0,3 M glicerol estimulasse a atividade da NR, uma vez que tem sido demonstrado que algas e plantas vasculares assimilam nitrato no escuro com o suprimento de uma fonte de carbono (Corzo & Niell, 1991; Huppe & Turpin, 1994). Entretanto, no tratamento com adição de 0,3 M glicerol, tanto a atividade *in vitro* NR quanto a concentração de proteínas solúveis foram inferiores ao controle e ao tratamento com maior irradiância (Figuras 4.9 e 4.11). A atividade específica da NR foi semelhante ao controle, provavelmente, devido à diferença observada no teor de proteínas, e menor que o tratamento com $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 4.10).

O efeito inibitório do glicerol pode estar relacionado à concentração utilizada no experimento, que poderia ter provocado um aumento da osmolalidade do meio de cultivo (Robaina *et al.*, 1990), ou ao efeito tóxico resultante da não metabolização do carbono (Kumar *et al.*, 2004). Isto poderia indicar que o glicerol não seria uma fonte de carbono adequada para ser usada com *Gp. tenuifrons*. Além disso, é possível que o suprimento de uma fonte de carbono seja efetivo para estimular o metabolismo de um organismo apenas na fase de escuro, atuando de forma diferente durante o fotoperíodo.

No tratamento com $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi observada uma redução na porcentagem de remoção de nitrato em relação ao controle (Figura 4.12). Para *G. tenuistipitata*, foi observado que a remoção de nitrato ocorre principalmente durante o período de escuro, embora a maior atividade da NR seja detectada após 6-8 h do início do fotoperíodo (Lopes, 2001). A autora considerou que durante o fotoperíodo poderia ocorrer a inativação das permeases responsáveis pela translocação do nitrato para o meio intracelular. Isto indicaria que a captação de nitrato e sua redução poderiam ocorrer independentemente (Lopes, 2001).

Por outro lado, Nishihara *et al.* (2005) observaram aumento na taxa de captação de nitrato por *L. brongniartii* com a elevação da irradiância e atribuíram este resultado ao consumo das reservas internas de nitrogênio devido ao aumento da atividade fotossintetizante. Entretanto, as irradiâncias empregadas nesse estudo foram de 15 ou 40 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, valores menores do que os utilizados neste experimento.

A porcentagem de remoção de nitrato do meio de cultivo no tratamento com acréscimo de 0,3 M glicerol foi semelhante ao controle (Figura 4.12). Uma vez que ambos estavam sob $65 \pm 5 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e que sob $500 \pm 10 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve

queda na porcentagem de remoção de nitrato, é possível que a luz tenha efeito direto sobre a regulação da captação de nitrato (Crawford, 1995; Tischner, 2000; Lopes, 20011).

Embora os resultados não sejam conclusivos, aqueles verificados no tratamento com $500 \pm 10 \mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ poderiam corroborar a hipótese sugerida inicialmente. Assim, a possível indução da fotossíntese, através do aumento da irradiância, poderia estimular a atividade da NR, acoplando o metabolismo do carbono e do nitrogênio.

A baixa porcentagem de nitrato removido nas 24 h após a renovação do meio de cultivo e durante o experimento, mesmo com o aumento da atividade da NR observado no tratamento com maior irradiância, sugere uma saturação intracelular de nitrato, uma vez que as algas prontamente captam o nitrato disponível no meio quando suas reservas intracelulares estão reduzidas ou esgotadas (Harrison *et al.*, 1986; McGlathery *et al.*, 1996; Young *et al.*, 2009). Isto poderia indicar um desequilíbrio entre a captação de nitrato e a taxa de crescimento da alga e, portanto, haveria acúmulo de compostos nitrogenados não incorporados, como aminoácidos livres (Tischner, 2000). Além disso, alguns trabalhos indicam que em algas com alto conteúdo tecidual de nitrogênio a captação de nitrato mantém-se baixa até que as reservas intracelulares sejam consumidas (McGlathery *et al.*, 1996; Naldi & Wheeler, 2002).

Uma vez que o nitrato estaria presente no meio intracelular, haveria indução da síntese da NR (Solomonson & Barber, 1990; Crawford & Arst, 1993; Tischner, 2000). O aumento da atividade da NR no tratamento com maior irradiância indicaria que a enzima está presente. Porém, ao menos nas 24 h subseqüentes à troca do meio de cultivo, a NR estaria majoritariamente na forma inativa devido ao mecanismo de *feedback* negativo provocado pelo acúmulo intracelular de compostos nitrogenados.

Com o aumento de irradiância e, possivelmente, da produção de esqueletos carbônicos, os compostos nitrogenados poderiam ser deslocados para outras rotas metabólicas. O incremento na concentração de proteínas solúveis indicaria que os aminoácidos livres ou outras moléculas nitrogenadas estariam sendo deslocados para a síntese de proteínas. Conseqüentemente, a atividade da NR seria estimulada. Como o aumento da atividade da NR foi constatado após 10 min de experimento, é provável que, neste caso, a regulação da enzima seja pós-traducional, através da desfosforilação da mesma.

Durante os 28 dias de cultivo das algas foi constatado que quase todo o nitrato adicionado ao meio (250 μM) era captado ao final de cada semana (item 4.3.1, Figura 4.13d). Isto sugere que as reservas intracelulares de nitrato são consumidas no decorrer da

semana para sustentar o crescimento da alga. Dessa forma, em algas mantidas em condições de alta disponibilidade de nitrato por um longo período, é possível que a atividade da NR seja maior no segundo ou terceiro dia após a renovação do meio de cultivo, e não após 24 h, quando as amostras são coletadas e congeladas para a realização do ensaio enzimático.

Portanto, em *Gp. tenuifrons* é provável que a atividade da NR, sob as condições de experimentação empregadas neste estudo, esteja relacionada ao acúmulo de compostos nitrogenados e ao estoque intracelular de nitrato. Porém, em *Enteromorpha* sp. (Lartigue & Sherman, 2005), *Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Fucus spiralis* e *Fucus vesiculosus* (Young *et al.*, 2007), a atividade da NR parece ser fortemente regulada em resposta a disponibilidade de nitrato no meio externo. Esta diferença possivelmente deve-se ao fato de esses estudos terem sido realizados com algas recém coletadas do mar, onde a disponibilidade de nitrato é variável e inferior às empregadas no presente trabalho.

4.3. Taxa de captação e porcentagem de remoção de nitrato e fosfato e reservas intracelulares de nitrogênio.

4.3.1. Taxa de captação e porcentagem de remoção de nitrato e fosfato

O lote de água do mar usado nos experimentos continha $1,75 \pm 0,28 \mu\text{M}$ de nitrato, $0,19 \pm 0,03 \mu\text{M}$ de nitrito, $0,66 \pm 0,07 \mu\text{M}$ de amônio e $0,74 \pm 0,22 \mu\text{M}$ de fosfato. A adição de VS-N 50% elevou a concentração de fosfato no meio de cultivo para $18,20 \pm 0,60 \mu\text{M}$.

A taxa de captação e a porcentagem de remoção de nitrato do meio de cultivo por *Gp. tenuifrons* mantiveram-se constantes ao longo das quatro semanas de experimento para os tratamentos com VS-N 50%, VS-N 50% + $50 \mu\text{M NO}_3^-$ e VS-N 50% + $150 \mu\text{M NO}_3^-$ (Figuras 4.13a, 4.13b e 4.13c). Apenas no tratamento com adição de $250 \mu\text{M}$ de nitrato a taxa de captação e a porcentagem de remoção de nitrato do meio de cultivo variaram ao longo do período experimental (Figura 4.13d). A taxa de captação de nitrato caiu de $34,62 \pm 0,38 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para $30,79 \pm 0,67 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a porcentagem de remoção de nitrato diminuiu de 99,95% para 88,26% após as quatro semanas de cultivo (Figura 4.13d).

A média da taxa de captação de nitrato das quatro semanas de experimento nos tratamentos com VS-N 50%, VS-N 50% + $50 \mu\text{M NO}_3^-$, VS-N 50% + $150 \mu\text{M NO}_3^-$ ou VS-N 50% + $150 \mu\text{M NO}_3^-$ foram $0,22 \pm 0,01 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $7,65 \pm 0,04 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $21,25 \pm 0,32 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $32,25 \pm 1,82 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente, havendo diferença significativa entre todos os tratamentos ($p < 0,0002$) (Figura 4.14). A média da

porcentagem de remoção foi 93,27%, 99,85%, 99,96% e 93,05%, respectivamente (Figura 4.14).

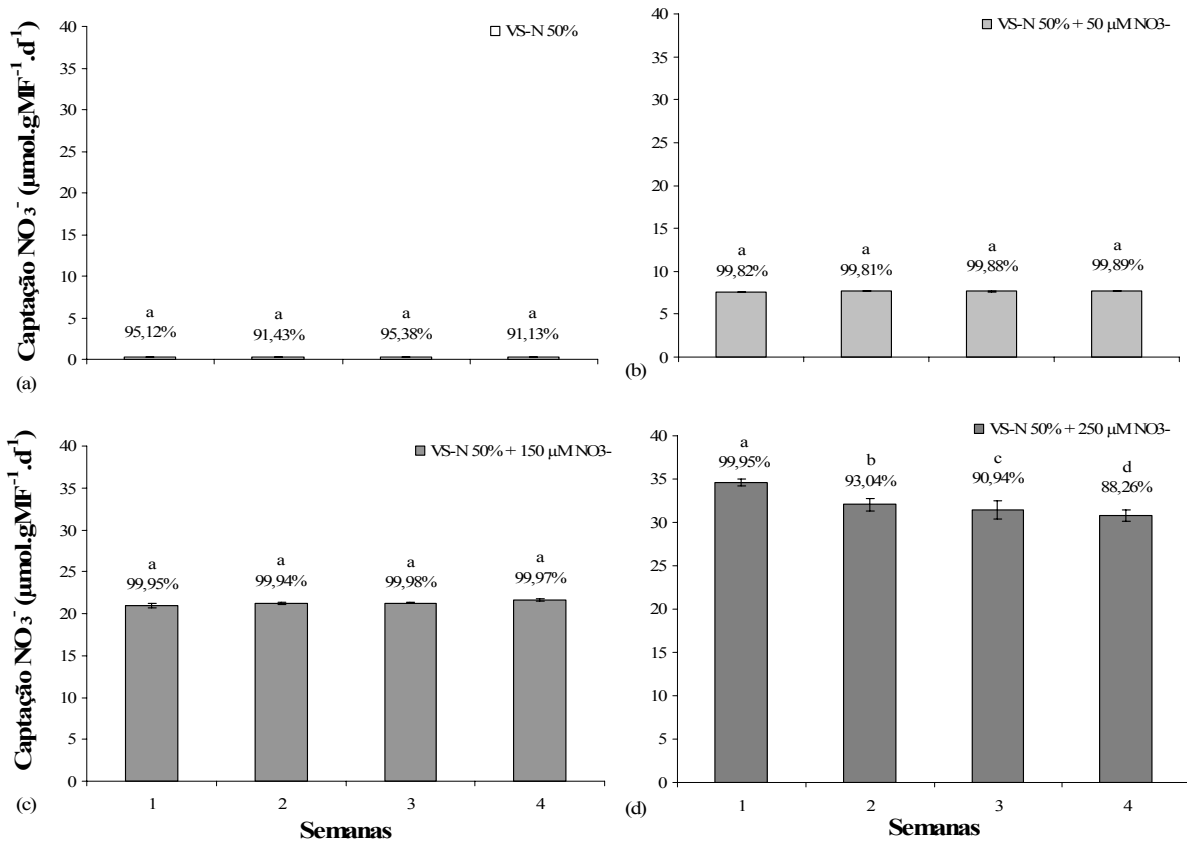


Figura 4.13. Taxa de captação de nitrato ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}.\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em: (a) VS-N 50%, (b) VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$, (c) VS-N 50% + 150 $\mu\text{M NO}_3^-$ e (d) VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$, durante 4 semanas, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de nitrato em cada semana, para cada tratamento.

As taxas de captação de nitrato após 24 h da última renovação do meio cultivo (no dia do congelamento das amostras para análise das reservas intracelulares) nos tratamentos com VS-N 50%, VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$, VS-N 50% + 150 $\mu\text{M NO}_3^-$ ou VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$ foram $0,11 \pm 0,01 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $6,72 \pm 0,37 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $2,86 \pm 0,84 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $1,07 \pm 0,72 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente, sendo que apenas os tratamentos sem adição de nitrato e com acréscimo de 250 μM foram semelhantes entre si ($p = 0,2521$) (Figura 4.14). As médias das porcentagens de remoção foram 87,05%, 82,40%, 13,68% e 1,82%, respectivamente (Figura 4.14). A taxa de captação e a porcentagem de remoção de nitrato após 24 h foram semelhantes às médias das quatro semanas apenas nos tratamentos com VS-N 50% ($p = 0,8519$) ou VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$ ($p = 0,1275$) (Figura 4.14). Nos

demais tratamentos, houve diferença significativa entre os parâmetros medidos após as 24 h de experimento e a média das quatro semanas ($p < 0,0002$).

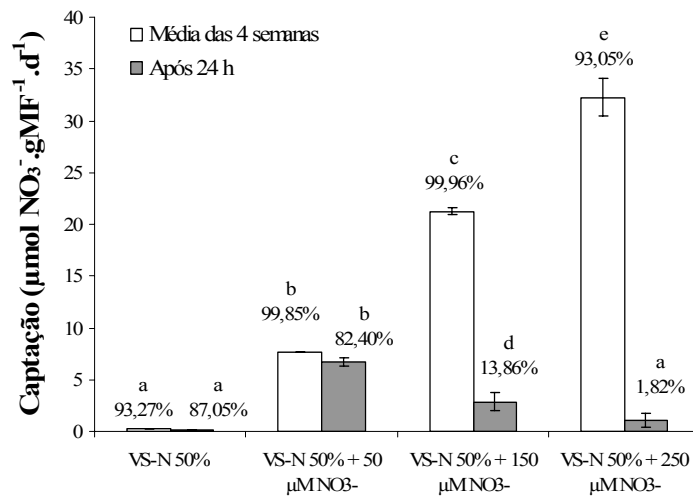


Figura 4.14. Taxa de captação de nitrato ($\mu\text{mol}\cdot\text{gMF}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo: i) média das taxas de captação das quatro semanas experimentais e ii) taxa de captação após 24 h da última renovação do meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de nitrato das quatro semanas experimentais e a porcentagem de remoção após 24 h da última renovação do meio de cultivo, para cada tratamento.

A taxa de captação e a porcentagem de remoção de nitrato aumentaram de acordo com a disponibilidade desse nutriente no meio de cultivo (Figuras 4.13 e 4.14). Isto indicaria que o mecanismo de captação de nitrato é substrato induzível. A única exceção foi a média da porcentagem de remoção no tratamento com adição de 250 μM de nitrato, a qual foi inferior a dos tratamentos com acréscimo de 50 ou 150 μM de nitrato (Figura 4.14). Apesar da média da porcentagem de remoção de nitrato ter sido menor no tratamento com 250 μM , a quantidade total de nitrato captado pelas algas foi maior neste tratamento.

Durante as quatro semanas de experimento, não houve redução da taxa de captação e da porcentagem de remoção de nitrato pelas algas cultivadas em VS-N 50%, em meio com adição de 50 ou 150 μM de nitrato (Figuras 4.13a, 4.13b e 4.13c). Isto indicaria que nestas condições não ocorreu saturação intracelular de nitrato, o que poderia causar a redução das taxas de captação e da porcentagem de remoção desse nutriente (McGlathery, *et al.*, 1996; Naldi & Wheeler, 2002). Já no tratamento com acréscimo de 250 μM de nitrato, houve uma queda significativa na taxa de captação e na porcentagem de remoção de nitrato ao longo das quatro semanas experimentais (Figura 4.13d). As altas taxas de

captação de nitrato observadas nesse tratamento não indicariam ocorrência de saturação dos sistemas de transporte de nitrato (enzima H^+ -ATPase) (Figura 4.13d). A redução poderia estar relacionada à saturação interna de nitrato, ou seja, o nitrato não estaria sendo reduzido tão rapidamente quanto seu estoque interno é preenchido (Pedersén, 1994; Lartigue & Sherman, 2005). Isto possivelmente deveu-se à limitação de irradiância ou fontes de carbono, o que poderia ser evidenciado pela taxa de crescimento apresentada pelas algas mantidas em meio com adição de 250 μM de nitrato, que foi semelhante a das algas cultivadas em meio com 150 μM de nitrato (Figura 4.2). A saturação interna de nitrato poderia ser corroborada pelas baixas taxa de captação e porcentagem de remoção desse nutriente 24 h após a renovação do meio de cultivo (Figura 4.14), uma vez que algas bem nutridas captam nitrato mais lentamente em relação às algas com deficiência nutricional (Fong *et al.*, 2003). Porém, apesar da redução observada no tratamento com adição de 250 μM de nitrato, as algas mantiveram-se captando nitrato em excesso, em relação às necessidades imediatas de crescimento, o que indicaria grande capacidade de armazenamento interno de nitrato por *Gp. tenuifrons* (Lapointe & Duke, 1984; Smit, 2002).

Para algumas macroalgas tem sido reportado que a taxa captação de nitrato segue uma cinética de saturação (Smit, 2002; Nishihara *et al.* 2005; Rees *et al.*, 2007; Kregting *et al.*, 2008). Em *G. gracilis* exposta a concentrações de nitrato variando de 0 a 50 μM foi observado $K_m = 5,6 \mu\text{M}$ para algas previamente mantidas em meio com disponibilidade de nitrato e $K_m = 4,2 \mu\text{M}$ para algas previamente cultivadas em condições de limitação de nitrato, ambas a 20 °C (Smit, 2002). Rees *et al.* (2007) também testaram concentrações de nitrato entre 0 e 50 μM e observaram $K_m < 20 \mu\text{M}$ para *Pterocladia capillacea*, *Ulva intestinalis* e *Xiphophora chondrophylla*. Em *L. brongniartii* exposta a maiores concentrações de nitrato, variando de 0 a 300 μM , foi verificado $K_m = 12,7 \mu\text{M}$ sob 15 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $K_m = 55,6 \mu\text{M}$ sob 40 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Nishihara *et al.*, 2005). Os autores atribuem o maior K_m observado em 40 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ao consumo das reservas de nitrogênio devido à atividade fotossintetizante.

Entretanto, considerando-se as médias para cada tratamento, é possível observar um incremento linear na taxa de captação de nitrato por *Gp. tenuifrons* nas condições experimentais empregadas no presente trabalho (Figura 4.14). Este mesmo fato foi observado nas linhagens marrom e verde de *H. musciformis* cultivadas em concentrações de nitrato variando de 0 a 100 μM (Martins, 2007).

A taxa de captação e a porcentagem de remoção de fosfato do meio de cultivo por *Gp. tenuifrons* variou durante as quatro semanas de experimento em todos os tratamentos

(Figura 4.15). No tratamento com VS-N 50%, as taxas de captação e porcentagens de remoção de fosfato na primeira e terceira semanas foram semelhantes entre si ($p = 0,1710$), cerca de $0,80 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 30%, respectivamente (Figura 4.15a). Na segunda semana de experimento, a taxa de captação de fosfato foi $1,20 \pm 0,08 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a remoção foi 45,51% (Figura 4.15a). Na quarta semana foram observadas as maiores taxa de captação e porcentagem de remoção de fosfato, $1,55 \pm 0,14 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 61,61%, respectivamente (Figura 4.15a). No tratamento com adição de $50 \mu\text{M}$ de nitrato, a taxa de captação de fosfato caiu de $1,75 \pm 0,04 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ na primeira semana para $1,34 \pm 0,05 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ na última semana de experimento (Figura 4.15b), sendo que as taxas na primeira, segunda e terceira semanas foram semelhantes entre si ($p > 0,3878$), assim como as taxas na terceira e quarta semanas ($p = 0,0674$). Nesse tratamento, a porcentagem de remoção de fosfato variou de 66,69% até 51,29% (Figura 4.15b). As algas mantidas em meio com acréscimo de $150 \mu\text{M}$ de nitrato apresentaram taxas de captação e porcentagens de remoção de fosfato constantes ao longo das três primeiras semanas de experimento ($p > 0,2272$). Na quarta semana, a taxa de captação de fosfato diminuiu de $2,07 \pm 0,09 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para $1,52 \pm 0,52 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a remoção de 73,68% para 59,43% (Figura 4.15c). No tratamento com adição de $250 \mu\text{M}$ de nitrato, a taxa de captação e a porcentagem de remoção de fosfato foram maiores na primeira semana, $2,27 \pm 0,15 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 87,86%, respectivamente (Figura 4.15d). A partir da segunda semana, a taxa de captação de fosfato ficou ao redor de $1,70 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a remoção entre 70,93% e 63,67% ($p > 0,5877$) (Figura 4.15d).

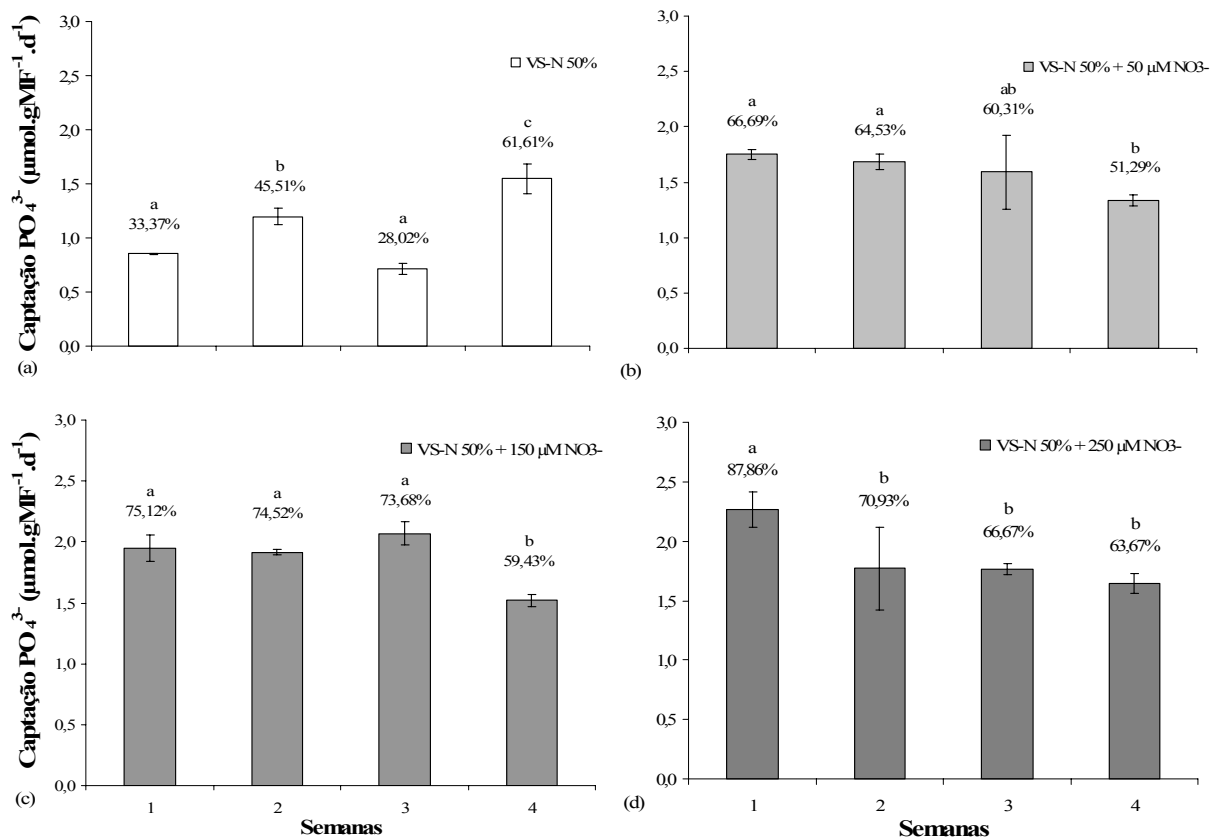


Figura 4.15. Taxa de captação de fosfato inorgânico ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}.\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em: (a) VS-N 50%, (b) VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$, (c) VS-N 50% + 150 $\mu\text{M NO}_3^-$ e (d) VS-N 50% + 250 $\mu\text{M NO}_3^-$, durante 4 semanas, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de fosfato em cada semana, para cada tratamento.

No tratamento com VS-N 50%, a média da taxa de captação de fosfato das quatro semanas experimentais foi $1,08 \pm 0,39 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a porcentagem de remoção foi 42,13% (Figura 4.16). A taxa de captação foi significativamente menor que os valores observados nas demais condições ($p < 0,0027$), os quais foram semelhantes entre si ($p > 0,1023$). Nos tratamentos com adição de 50, 150 ou 250 μM de nitrato, as médias das taxas de captação de fosfato foram $1,59 \pm 0,24 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, $1,86 \pm 0,25 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $1,86 \pm 0,33 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente (Figura 4.16). A porcentagem de remoção variou de 60,71% a 72,28% (Figura 4.16).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto aos valores de taxa de captação e porcentagem de remoção de fosfato após 24 h da última renovação do meio e cultivo ($p > 0,8382$). Tais valores foram inferiores às médias das quatro semanas de experimento para os respectivos tratamentos (Figura 4.16).

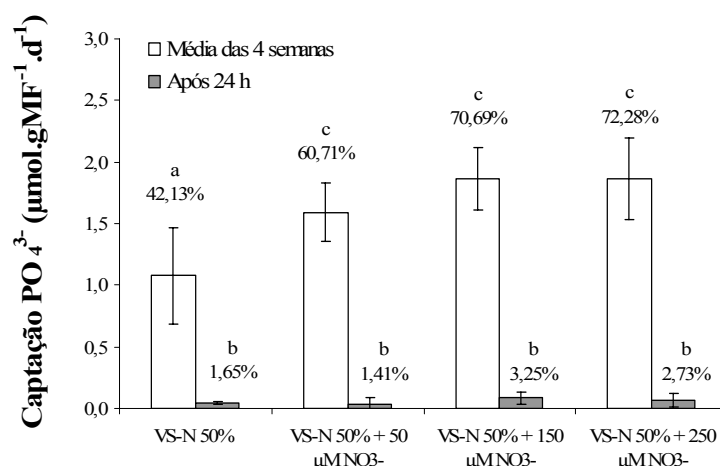


Figura 4.16. Taxa de captação de fosfato inorgânico ($\mu\text{mol.gMF}^{-1}.\text{d}^{-1}$) por *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo: i) média das taxas de captação das quatro semanas experimentais e ii) taxa de captação após 24 h da última renovação do meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$). São apresentadas as médias da porcentagem de remoção de fosfato das quatro semanas experimentais e a porcentagem de remoção após 24 h da última renovação do meio de cultivo, para cada tratamento.

As taxas de captação de nitrato e de fosfato de todos os tratamentos foram utilizadas para verificar a existência de correlação entre esses parâmetros. Sob as condições empregadas neste experimento, não foi observada correlação entre as taxas ($p = 0,1170$), sendo encontrado um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,8829 para o conjunto de dados.

A taxa de captação de porcentagem de remoção de fosfato variou o longo das semanas em todos os tratamentos (Figura 4.15). Isto indicaria que, nas condições testadas, a captação de fosfato não estaria diretamente relacionada à captação de nitrato (Figura 4.13), o que poderia ser corroborado pela inexistência de correlação entre a taxa de captação de nitrato e a de fosfato. Observando-se as porcentagens de remoção de fosfato (Figura 4.15), nota-se que em todos os tratamentos havia uma considerável quantidade desse nutriente remanescente no meio de cultivo. Portanto, poder-se-ia descartar a disponibilidade de fosfato como fator limitante ao crescimento das algas no tratamento com adição de 250 μM de nitrato (Figura 4.2).

As baixas taxas de captação e porcentagens de remoção de fosfato 24 h após a última renovação do meio de cultivo em todos os tratamentos (Figura 4.16) seriam outros

indícios de que a captação de fosfato não estaria diretamente acoplada à captação de nitrato.

4.3.2. Reservas intracelulares de nitrogênio

4.3.2.1. Pigmentos fotossintetizantes (ficobiliproteínas e clorofila *a*)

As algas cultivadas em VS-N 50% apresentaram as menores concentrações de ficoeritrina e ficocianina, cerca de $360 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $36 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente (Figuras 4.17a e 4.17b). Aquelas mantidas em VS-N 50% + $50 \mu\text{M}$ de nitrato continham $881 \pm 68,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ de ficoeritrina (Figura 4.17a) e $74 \pm 3,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ de ficocianina (Figura 4.17b). No tratamento com adição de $150 \mu\text{M}$ de nitrato, as algas apresentaram $1685 \pm 143 \mu\text{g.g}^{-1}$ de ficoeritrina (Figura 4.17a) e $103 \pm 8,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ de ficocianina (Figura 4.17b). As algas cultivadas em meio com acréscimo de $250 \mu\text{M}$ de nitrato exibiram as maiores concentrações de ficobiliproteínas, sendo $2038 \pm 360 \mu\text{g.g}^{-1}$ de ficoeritrina (Figura 4.17a) e $126 \pm 22,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de ficocianina (Figura 4.17b).

A razão entre ficoeritrina e ficocianina (FE:FC) também foi menor no tratamento com VS-N 50%, aproximadamente 10,0 (Figura 4.17c). As algas mantidas em meio com adição de $50 \mu\text{M}$ de nitrato apresentaram razão FE:FC intermediária, cerca de 12,0 (Figura 4.17c). Não houve diferença significativa entre os tratamentos com adição de 150 ou $250 \mu\text{M}$ de nitrato com relação à razão FE:FC ($p = 0,9073$), a qual ficou próxima a 16,3 (Figura 4.17c).

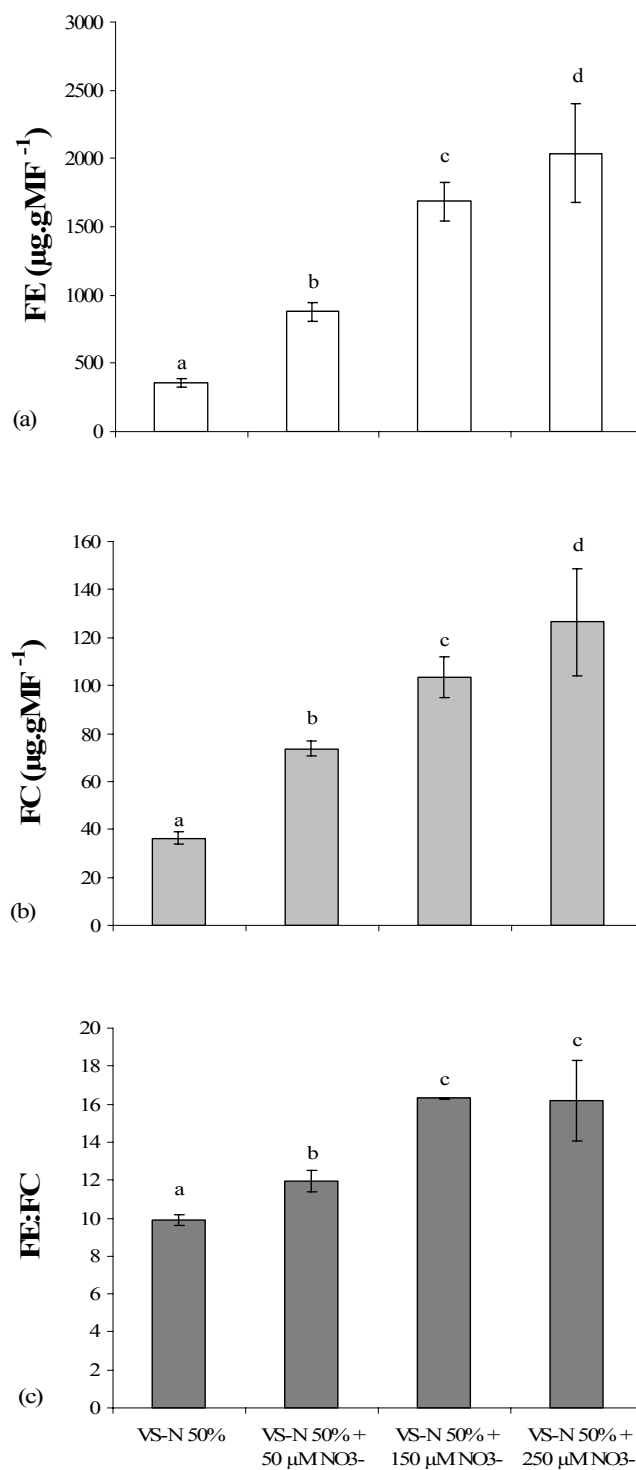


Figura 4.17. Concentração de (a) ficoeritrina e (b) ficocianina ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) e (c) razão entre ficoeritrina e ficocianina de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em *Gp. tenuifrons*, foi observado um incremento nas concentrações de ficoeritrina e ficocianina com o aumento da disponibilidade de nitrato do meio de cultivo (Figuras 4.17a e 4.17b), o que pode ser constatado pela coloração das algas (Figura 4.1). Estes resultados estão de acordo com o reportado para outras Gracilariaceae submetidas a diferentes condições de nitrogênio, como *G. tikvahiae* (Lapointe & Duke, 1984), *Gracilaria* sp. (Andria *et al.*, 1999) e *G. birdiae* (Costa, 2005). As ficobiliproteínas, especialmente a ficoeritrina, a qual está localizada mais externamente na estrutura do ficobilissomo, constituem uma importante reserva intracelular de nitrogênio nas algas vermelhas, sendo uma das primeiras macromoléculas consumidas quando a alga encontra-se sob deficiência de nitrogênio (Bird *et al.*, 1982; Glazer, 1982; Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1995; Porra *et al.*, 1997; Andria *et al.*, 1999). Dessa forma, a degradação das ficobiliproteínas seria importante para a manutenção do metabolismo da alga e para sustentar o crescimento da mesma (Figura 4.2).

Devido ao menor conteúdo de ficoeritrina e ficocianina nas algas cultivadas em VS-N 50% ou VS-N 50% + 50 μM NO_3^- , a razão FE:FC nestes tratamentos também foi baixa (Figura 4.17c). Os tratamentos com adição de 150 ou 250 apresentaram as maiores razões FE:FC, as quais foram semelhantes entre si (Figura 4.17c). Isto poderia indicar que, sob as condições empregadas neste estudo, uma razão FE:FC próxima a 16 seria ótima para sustentar o máximo crescimento de *Gp. tenuifrons*, atingido com o cultivo das algas em meio com adição de nitrato em concentração igual ou superior a 150 μM (Figura 4.2).

O conteúdo de clorofila *a* foi menor em *Gp. tenuifrons* cultivada em VS-N 50%, cujo valor foi $256 \pm 5,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 4.18). As algas mantidas em meio com adição de 50 μM de nitrato continham $319 \pm 7,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de clorofila *a*. Aquelas cultivadas em meio com acréscimo de 150 ou 250 μM de nitrato apresentaram valores de concentração de clorofila *a* semelhantes entre si ($p = 0,0898$), cerca de $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 4.18).

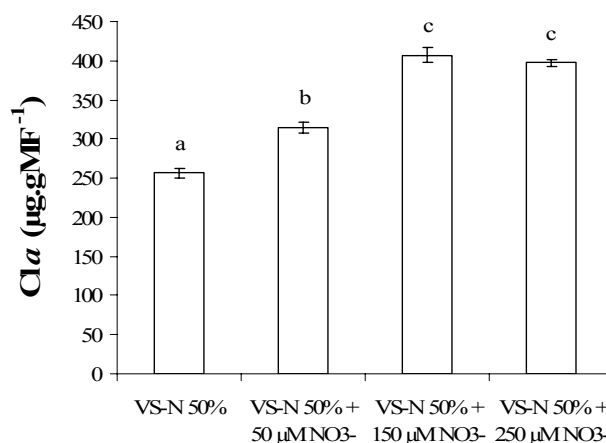


Figura 4.18. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A concentração de clorofila *a* presente nas algas cultivadas em VS-N 50% ou VS-N 50% + 50 $\mu\text{M NO}_3^-$ também foi inferior aos demais tratamentos com alta disponibilidade de nitrato (Figura 4.18), conforme foi verificado em outras rodófitas, como *G. tenuistipitata* (García-Sánchez *et al.*, 1993), *Gracilaria* sp. (Andria *et al.*, 1999), *G. birdiae* (Costa, 2005). As concentrações de clorofila *a* e ficobiliproteínas no tratamento com VS-N 50% correspondem a 64,0% e 18,3 %, respectivamente, daquelas observadas no tratamento com adição de 250 μM de nitrato. Isto indicaria que a clorofila *a* é um pigmento essencial à manutenção do metabolismo da alga. Assim, a clorofila *a* atuaria como uma reserva secundária de nitrogênio nas algas vermelhas (Bird *et al.*, 1982; García-Sánchez *et al.*; 1993, Andria *et al.*, 1999). O conteúdo de clorofila *a* seguiu o mesmo padrão da razão FE:FC e poderia estar relacionado às taxas de crescimento observadas para a espécie neste estudo (Figura 4.2), uma vez que o conteúdo de clorofila *a* também atingiu um patamar a partir de 150 μM de nitrato (Figura 4.18).

4.3.2.2. Proteína solúvel total

As algas cultivadas em VS-N 50% apresentaram a menor concentração de proteína solúvel total, $2243 \pm 133 \mu\text{g.g}^{-1}$ (Figura 4.19a). No tratamento com adição de 50 μM de nitrato, *Gp. tenuifrons* apresentou $3680 \pm 36 \mu\text{g.g}^{-1}$ de proteína solúvel (Figura 4.19a). As algas cultivadas em meio com acréscimo de 150 μM de nitrato continham $4249 \pm 428 \mu\text{g.g}^{-1}$ de proteína solúvel (Figura 4.19a). Aquelas submetidas ao tratamento com acréscimo de 250 μM de nitrato exibiram a maior concentração de proteína solúvel,

cujo valor foi $5370 \pm 620 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 4.19a). Estes resultados estão de acordo com o observado no primeiro experimento (Figura 4.8), em que o teor de proteína solúvel foi menor nas algas sob deficiência de nitrato e aumentou de acordo com a adição de nitrato ao meio de cultivo.

A razão entre concentração de ficobiliproteínas (ficoeritrina e ficocianina) e proteínas solúveis (FBP:PS) foi menor nas algas cultivadas em VS-N 50%, cerca de 0,18 (Figura 4.19b). Aquelas mantidas em meio com adição de $50 \mu\text{M}$ de nitrato apresentaram razão FBP:PS intermediária, de aproximadamente 0,29 (Figura 4.19b). Os tratamentos com acréscimo de 150 ou $250 \mu\text{M}$ de nitrato apresentaram os maiores valores para a razão FBP:PS, cerca de 0,40, os quais foram semelhantes entre si ($p > 0,5673$) (Figura 4.19b).

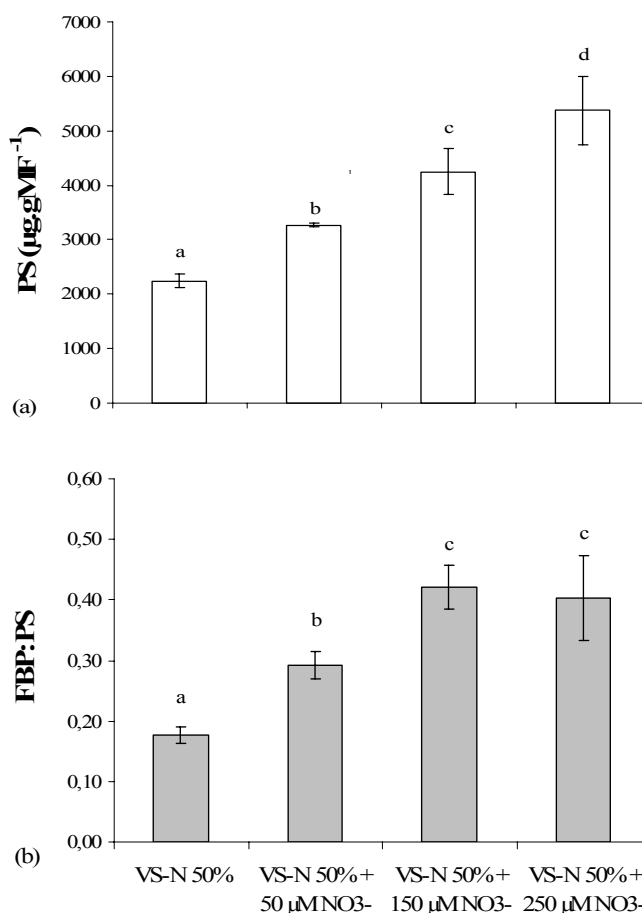


Figura 4.19. (a) Concentração de proteína solúvel total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{MF}^{-1}$) e (b) razão entre concentração de ficobiliproteínas (ficoeritrina e ficocianina) e proteínas solúveis de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Assim como as ficobiliproteínas (Figuras 4.17a e 4.17b), a concentração de proteínas solúveis também aumentou de acordo com o suplemento de nitrato no meio de

cultivo, atuando também como uma importante reserva intracelular de nitrogênio. Isto está em concordância com o observado em outras Gracilariaceae (Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1993; Andria *et al.*, 1999). Acredita-se que a limitação de nitrogênio em algas vermelhas redirecione o fluxo de metabólitos nitrogenados para a síntese de proteínas ditas não pigmentadas, ou seja, para rotas metabólicas não envolvidas na produção de ficobiliproteínas (Vergara & Niell, 1993; Andria *et al.*, 1999). Isto poderia ser confirmado pela razão FBP:PS observada nos tratamentos com VS-N 50% e com adição de 50 μM de nitrato (Figura 4.19b).

Portanto, em *Gp. tenuifrons* não foi observada saturação na taxa de captação de nitrato (Figura 4.14), a qual não estava correlacionada com a taxa de captação de fosfato, nas condições empregadas neste estudo. Também não foi verificada saturação na concentração de ficobiliproteínas (Figuras 4.17a e 4.17b) e proteínas solúveis (Figura 4.19a), sendo que as ficobiliproteínas constituem de 18% a 40% da quantidade total de proteínas solúveis, dependendo das condições nutricionais da alga. Além disso, o conteúdo de ficobiliproteínas Apenas o conteúdo de clorofila *a* apresentou um patamar a partir de 150 μM de nitrato (Figura 4.18), coincidindo com o patamar observado na taxa de crescimento. Isto poderia indicar uma saturação no direcionamento de energia para a fotossíntese, através da clorofila *a*, e na produção de esqueletos carbônicos necessários à assimilação do nitrato disponível no meio de cultivo. O acúmulo destes compostos nitrogenados provavelmente é responsável pelo maior conteúdo tecidual de nitrogênio observado nas algas cultivadas em meio com maior disponibilidade de nitrato (Figura 4.4c). Uma vez que ficobiliproteínas e proteínas solúveis, as principais macromoléculas de reserva de nitrogênio em rodófitas (Bird *et al.*, 1982; Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1993; Andria *et al.*, 1999), aparentemente, respondem mais rápido à disponibilidade de nitrogênio e que o conteúdo de clorofila *a* está diretamente relacionado à fotossíntese e é mais estável sob diferentes condições nutricionais, a análise conjunta desses parâmetros seria interessante para estimar o estado nutricional do organismo.

4.4. Rendimento e qualidade dos polissacarídeos

4.4.1. Crescimento

Os tratamentos realizados com *Gp. tenuifrons* e selecionados no primeiro experimento (item 4.1.3) também foram avaliados quanto ao rendimento e qualidade dos polissacarídeos. Devido à maior necessidade de material algáceo para as análises, foram utilizados ápices de 5 cm, na proporção de 10 g de massa fresca de alga por 1 L de meio de

cultivo, diferente dos ápices empregados nos demais experimentos, os quais tinham 2 cm de comprimento e foram mantidos na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Em virtude dessa mudança, a taxa de crescimento (TC), a porcentagem de massa seca e o conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio (CNH) foram novamente determinados.

As TCs, medidas semanalmente, variaram ao longo do período experimental em todos os tratamentos. Entretanto, optou-se por usar os valores de massa fresca acumulada durante os 28 dias de experimento para o cálculo das TCs, permitindo a comparação com as TCs obtidas no primeiro experimento, em que as algas foram cultivadas na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo.

As algas cultivadas em VS-N 50% ou VS-N 50% + 50 μM NO_3^- apresentaram TCs muito baixas, cerca de 0,30 $\%.\text{d}^{-1}$, e semelhantes entre si ($p = 0,2134$) (Figura 4.20). Os ápices mantidos em meio com adição de 150 ou 250 μM de nitrato exibiram TCs de $0,60 \pm 0,07 \%.\text{d}^{-1}$ e $0,81 \pm 0,01 \%.\text{d}^{-1}$, respectivamente (Figura 4.20).

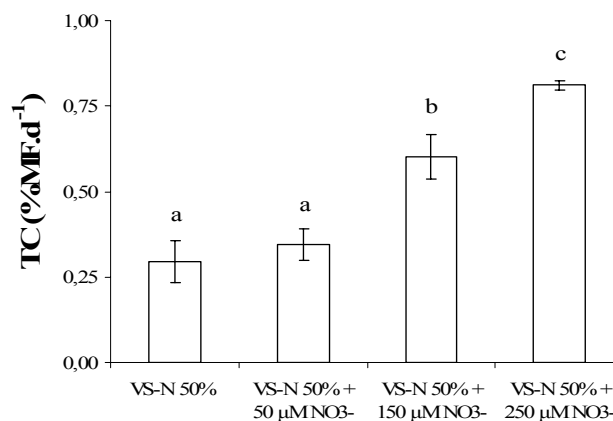


Figura 4.20. Taxa de crescimento ($\%MF.\text{d}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrito por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em todos os tratamentos, as TCs das algas mantidas na proporção de 10 g de massa fresca por litro de meio de cultivo foram inferiores às TCs observadas nas algas cultivadas na proporção de 1 g de massa fresca por litro de meio de cultivo (Figuras 4.2 e 4.20).

Enquanto no primeiro experimento a TC das algas cultivadas em VS-N 50% foi significativamente menor que a daquelas mantidas em meio com adição de 50 μM de nitrito, neste experimento não houve diferença entre esses tratamentos (Figura 4.20). Além disso, neste caso a TC das algas mantidas em meio com acréscimo de 250 μM foi superior

a daquelas cultivadas em meio com 150 μM de nitrato (Figura 4.20), diferente do observado no primeiro experimento, no qual não houve diferença entre os tratamentos (Figura 4.2). Isto sugere que a redução das TCs em relação ao primeiro experimento deveu-se a uma conjunção de fatores, sendo eles: i) a maior densidade de algas nos frascos de cultivo, o que atenuaria a irradiância recebida por elas devido ao sombreamento dos talos contidos no frasco e, conseqüentemente, reduziria a taxa fotossintetizante e ii) a menor proporção de nitrato disponível para cada grama de alga.

4.4.2. Porcentagem de massa seca e conteúdo tecidual de carbono, nitrogênio e hidrogênio

A porcentagem de massa seca foi maior nas algas mantidas em VS-N 50% ou VS-N 50% + 50 μM NO_3^- , cerca de 20%, não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,1926$) (Figura 4.21). No tratamento com acréscimo de 150 μM de nitrato houve uma pequena diminuição da porcentagem de massa seca para aproximadamente 19%, porém, foi semelhante à condição sem acréscimo de nitrato ($p = 0,0808$) (Figura 4.21). O tratamento com adição de 250 μM de nitrato apresentou a menor porcentagem de massa seca, cerca de 17,5% ($p < 0,0221$) (Figura 4.21).

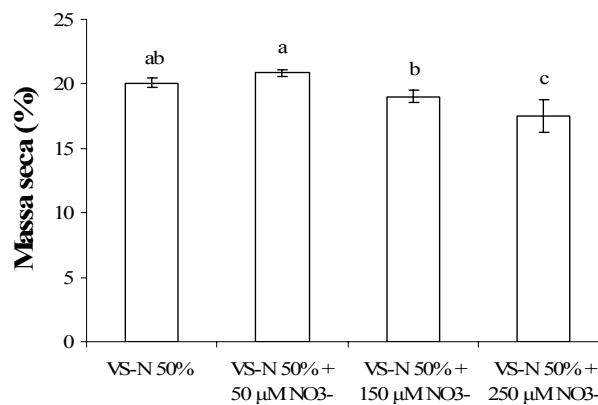


Figura 4.21. Massa seca (%) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Também houve diferença na porcentagem de massa seca de *Gp. tenuifrons* com a mudança na proporção de massa fresca da alga cultivada por litro de meio de cultivo. Foi observada uma redução na porcentagem de massa seca das algas cultivadas em VS-N 50% ou em meio com adição de 50 μM de nitrato em relação ao primeiro experimento (Figuras

4.3 e 4.21). Nos demais tratamentos, houve aumento da porcentagem de massa seca (Figuras 4.3 e 4.21). Possivelmente, este aumento deveu-se ao aproveitamento dos compostos nitrogenados em vias metabólicas não envolvidas diretamente no processo de crescimento.

O conteúdo tecidual de carbono foi maior nas algas cultivadas em VS-N 50% ou em meio com adição de 50 μM de nitrato, cerca de 300 mg.g^{-1} (Figura 4.22a), sendo que não houve diferença significativa entre estes tratamentos ($p = 0,1685$). As algas mantidas em meio com acréscimo de 150 ou 250 μM de nitrato apresentaram aproximadamente 292 mg.g^{-1} de carbono (Figura 4.22a), sendo estes tratamentos semelhantes ao com 50 μM de nitrato ($p > 0,2006$).

As algas cultivadas em VS-N 50% ou em meio com adição de 50 ou 150 μM de nitrato continham cerca de 50 mg.g^{-1} de hidrogênio tecidual (Figura 4.22b), não havendo diferença significativa entre estes tratamentos ($p > 0,1139$). O tratamento com adição de 250 μM de nitrato apresentou o menor teor de hidrogênio, cerca de 48 mg.g^{-1} (Figura 4.22b), o qual foi semelhante ao do tratamento com 150 μM de nitrato ($p = 0,3264$).

O conteúdo tecidual de carbono e de hidrogênio apresentou padrão semelhante ao observado para a porcentagem de massa seca (Figuras 4.21, 4.22a e 4.22b). Foi verificada uma redução no conteúdo de carbono e hidrogênio nas algas cultivadas em VS-N 50% ou em meio com adição de 50 μM de nitrato em relação ao primeiro experimento, e um aumento no teor destes elementos nos tratamentos com acréscimo de 150 ou 250 μM de nitrato (Figuras 4.4a, 4.4b, 4.22a e 4.22b).

As algas cultivadas em VS-N 50% apresentaram o menor conteúdo de nitrogênio tecidual, cerca de 13 mg.g^{-1} (Figura 4.22c). O tratamento com adição de 50 μM de nitrato exibiu o maior teor de nitrogênio, aproximadamente 22,7 mg.g^{-1} . As algas cultivadas em meio com acréscimo 150 ou 250 μM de nitrato continham $17,4 \pm 1,73$ mg.g^{-1} e $15,1 \pm 0,73$ mg.g^{-1} de nitrogênio, respectivamente (Figura 4.22c).

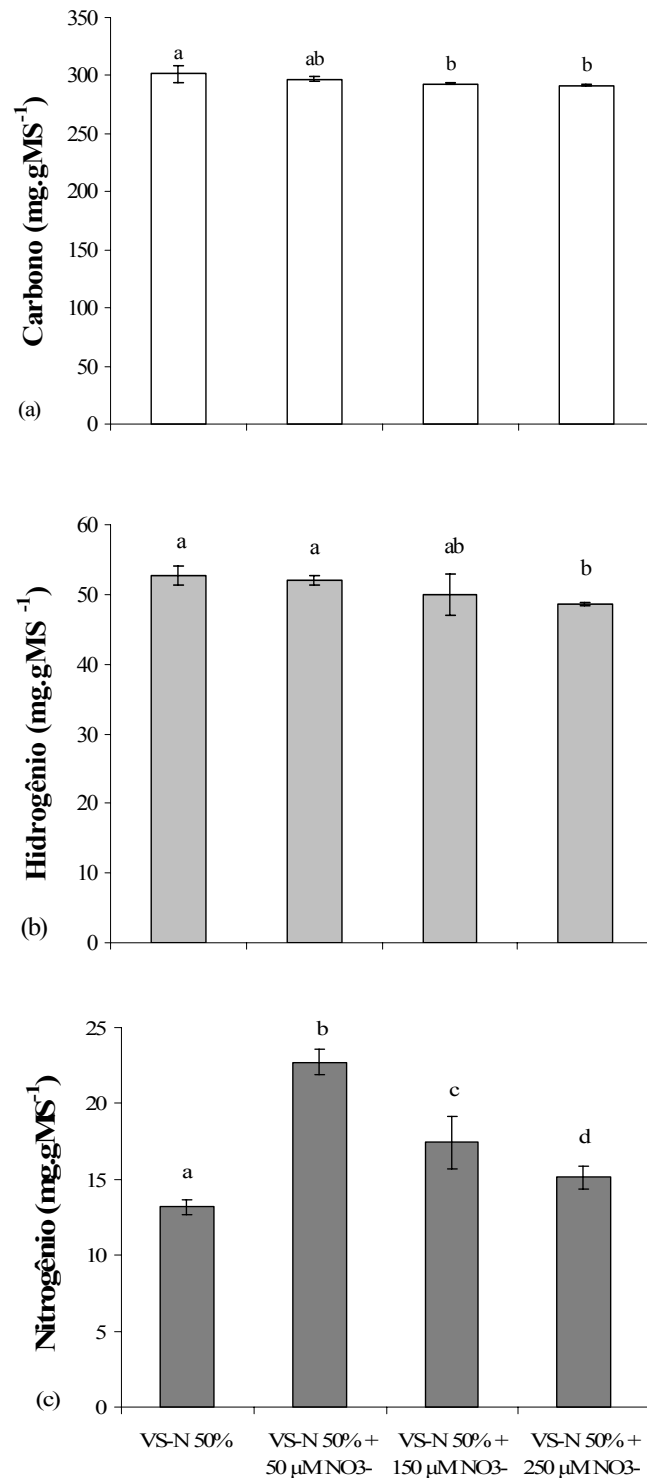


Figura 4.22. Conteúdo tecidual de (a) carbono, (b) hidrogênio e (c) nitrogênio (mg.gMS⁻¹) de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).

No primeiro experimento, em que *Gp. tenuifrons* foi cultivada na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, foi observado aumento no conteúdo de nitrogênio tecidual gradualmente à adição de nitrato no meio, exceto no tratamento com acréscimo de 750 μM de nitrato (Figura 4.4c). Com a mudança da proporção de massa fresca de alga por litro de meio de cultivo, o conteúdo de nitrogênio nas algas cultivadas em VS-N 50% foi inferior ao dos demais tratamentos (Figura 4.22c), porém maior que o valor encontrado para o mesmo tratamento no primeiro experimento (Figuras 4.4c). Porém, neste segundo experimento, o teor de nitrogênio foi maior no tratamento com adição de 50 μM de nitrato e decresceu com o aumento da disponibilidade de nitrato no meio de cultivo.

Os ápices mantidos em água do mar ou VS-N 50% apresentaram razão entre carbono e nitrogênio (C:N) próxima a 23 (Figura 4.23). As algas cultivadas em VS-N 50% + 50 μM NO_3^- apresentaram a menor razão C:N, cerca de 13 (Figura 4.23). Os tratamentos com adição de 150 ou 250 μM de nitrato exibiram C:N de $16,9 \pm 1,76$ e $19,3 \pm 1,00$, respectivamente (Figura 4.23). Devido à diferença do conteúdo tecidual de nitrogênio, as razões C:N apresentadas pelas algas cultivadas na proporção de 10 g de massa fresca por litro de meio de cultivo foram distintas das verificadas no primeiro experimento (Figura 4.5).

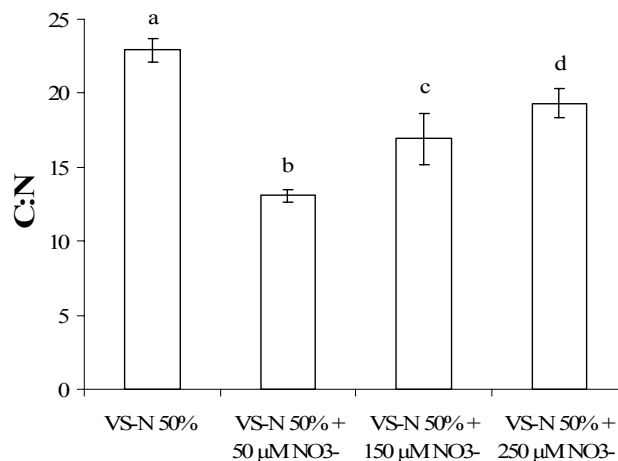


Figura 4.23. Razão C:N de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os dados de TC e razão C:N de todos os tratamentos foram utilizados para verificar a existência de correlação entre essas variáveis. Diferente do experimento em que as algas foram cultivadas em 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (Figura 4.6), sob as

condições empregadas neste experimento, não foi observada correlação entre os parâmetros ($p = 0,9810$), sendo encontrado um coeficiente de correlação de Pearson (r) de $-0,0077$ para o conjunto de dados.

O maior conteúdo tecidual de carbono verificado nas algas cultivadas em meio com adição de 150 ou 250 μM (Figura 4.22a), em relação ao primeiro experimento (Figura 4.4a), pode ser devido ao acúmulo de amido das florídeas ou floridosídeo, uma vez que haveria menos nitrato disponível para cada grama de alga (Lapointe & Duke, 1984; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999; Collén *et al.*, 2004; Costa 2005), condição que estimularia o armazenamento intracelular de reservas orgânicas.

No primeiro experimento, o conteúdo tecidual de nitrogênio aumentou com a maior disponibilidade de nitrato no meio (Figura 4.4c). Neste experimento, o teor de nitrogênio foi maior no tratamento com adição de 50 μM de nitrato, e diminuiu gradativamente à adição de nitrato do meio (Figura 4.22c). Isto provavelmente ocorreu devido à diluição do nitrogênio com o crescimento das algas (Figura 4.20), uma vez que a disponibilidade de nitrato por grama de alga era menor nos três tratamentos com adição desse nutriente, em relação ao primeiro experimento, realizado com algas mantidas proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (McGlathery *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 2004; Teichberg *et al.*, 2007).

No experimento com *Gp. tenuifrons* mantida na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, a razão C:N variou de acordo com os conteúdos teciduais de carbono e nitrogênio (Figura 4.5). Neste caso, a razão C:N variou apenas em função do conteúdo de nitrogênio (Figura 4.23), uma vez que as diferenças no teor de carbono entre os tratamentos foram muito pequenas (Figura 4.22a).

As TCs e as razões C:N não apresentaram correlação significativa. Isto poderia indicar que, nesta situação, o crescimento não refletiria o balanço entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio e que a razão C:N ainda seria um bom indicador do estado nutricional de *Gp. tenuifrons* (Barr & Rees, 2003).

Além disso, as diferenças apresentadas entre os resultados deste experimento e aquele realizado com algas cultivadas na proporção de 1 g de massa seca por 1 L de meio de cultivo, com relação à taxa de crescimento, porcentagem de massa seca e conteúdo tecidual de CNH, ressaltam a importância de estabelecer-se a proporção de massa fresca de material por volume de meio de cultivo em estudos fisiológicos e bioquímicos, uma vez que isto pode ser determinante nas respostas apresentadas pelo organismo, em curto e longo prazo (Pereira *et al.*, 2006).

4.4.3. Análise dos polissacarídeos

4.4.3.1. Rendimento e dosagens de carboidrato total e sulfato

O rendimento dos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons* variou de $28,5 \pm 1,45\%$ a $34,5 \pm 2,14\%$, em relação à massa seca da alga (Figura 4.24). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,2788$), é possível observar uma tendência a um rendimento mais baixo nas algas cultivadas em meio com adição de $50 \mu\text{M}$ nitrato (Figura 4.23), correspondente ao tratamento com o maior teor de nitrogênio tecidual (Figura 4.22c).

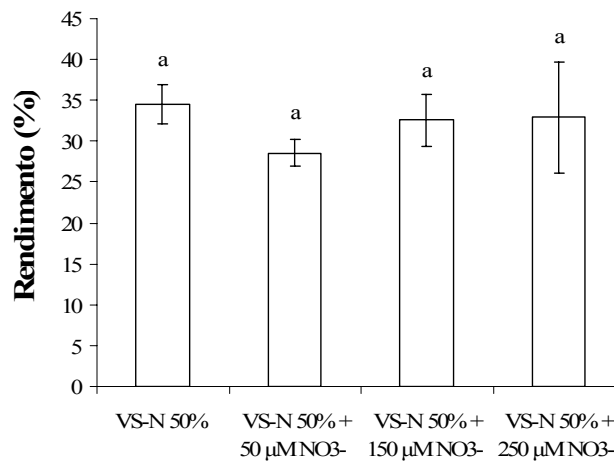


Figura 4.24. Rendimento dos polissacarídeos (%) extraídos de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo ($n = 3$). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Apesar de não ter havido diferenças significativas entre os tratamentos com relação ao rendimento dos polissacarídeos, foi realizada uma análise de correlação entre rendimento e conteúdo tecidual de nitrogênio. Foi observada uma correlação negativa entre as variáveis ($p = 0,0340$), com um coeficiente de correlação de Pearson (r) de $-0,6692$ para o conjunto de dados (Figura 4.25).

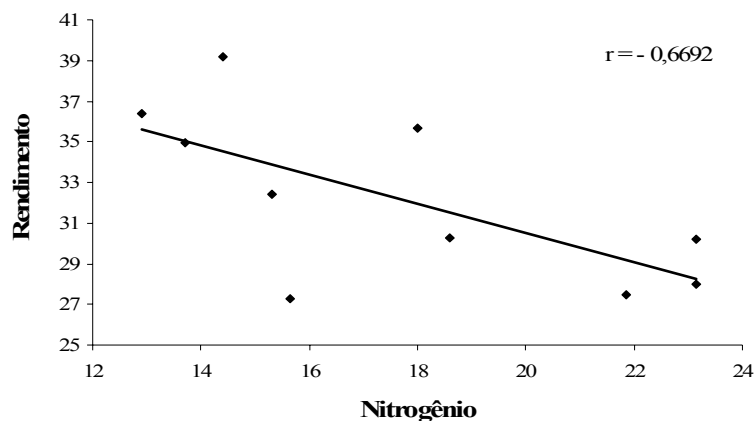


Figura 4.25. Correlação entre conteúdo de nitrogênio tecidual e rendimento dos polissacarídeos de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

Da mesma forma, foi analisada a existência de correlação ente a razão C:N e o rendimento dos polissacarídeos. Foi observada uma correlação positiva entre os parâmetros ($p = 0,0290$), com um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,6855 (Figura 4.26).

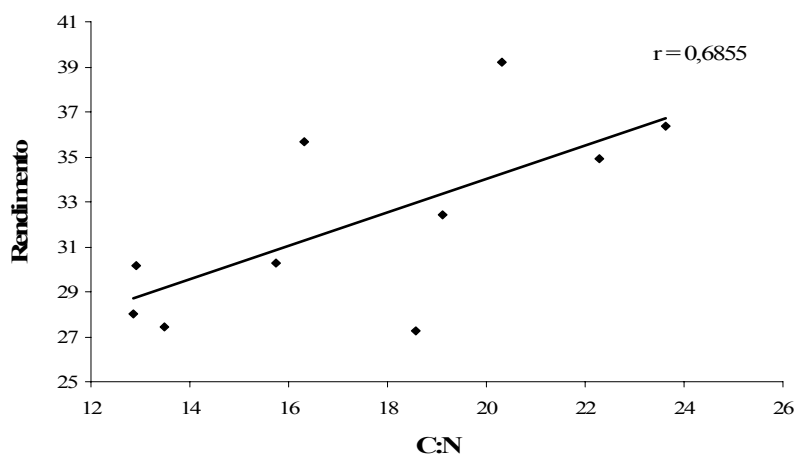


Figura 4.26. Correlação entre razão C:N e rendimento dos polissacarídeos de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

Com relação ao conteúdo de carboidrato total presente nos polissacarídeos, também não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,1609$). O teor de carboidratos variou de $59,2 \pm 4,75\%$ a $67,3 \pm 4,53\%$ (Figura 4.27).

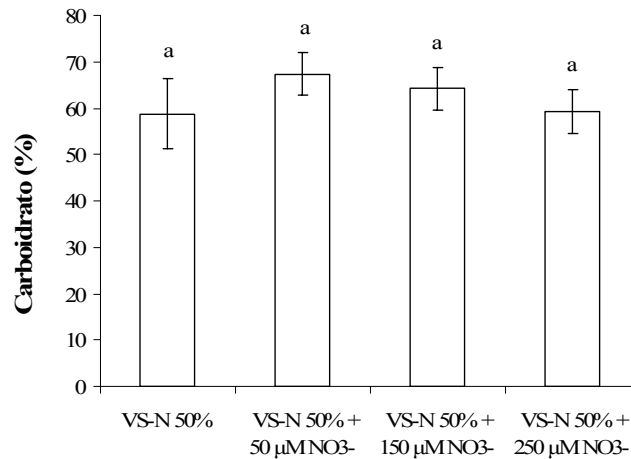


Figura 4.27. Conteúdo de carboidrato total (%) do polissacarídeo de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).

Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos com relação ao teor de sulfato (p = 0,0868), o qual variou de $4,3 \pm 0,81\%$ a $5,4 \pm 0,42\%$ (Figura 4.28).

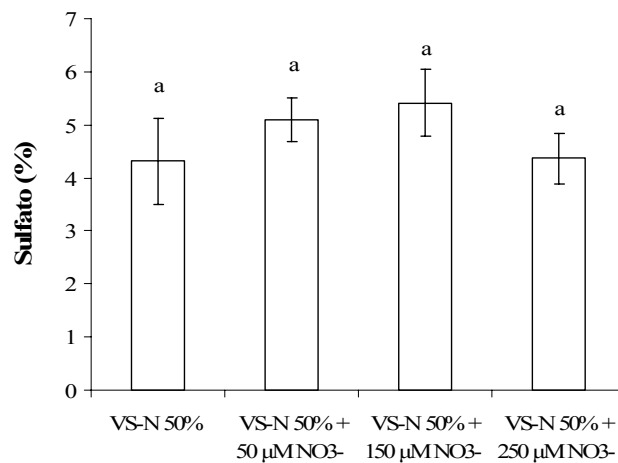


Figura 4.28. Conteúdo de sulfato (%) do polissacarídeo de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas (p < 0,05).

Sabe-se que a disponibilidade de nitrogênio no meio pode afetar o rendimento e a qualidade dos polissacarídeos (DeBoer, 1978; Bird *et al.*, 1981). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas quanto ao rendimento dos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato (Figura 4.24). O rendimento dos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons* está dentro da faixa de valores encontrados para outras

espécies de Gracilariaceae consideradas boas produtoras de ágar (Tabela 4.1). Os polissacarídeos das algas listadas na Tabela 4.1 também foram extraídos em água quente, sem tratamento alcalino, permitindo a melhor comparação das diferentes espécies. O tratamento alcalino muitas vezes é empregado na extração dos polissacarídeos pois aumenta a força do gel, visto que a base reage com a unidade α -L-galactopiranosose-6-sulfato, originando 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e liberando o grupo sulfato (Matulewicz, 1996). Porém, o tratamento alcalino geralmente diminui a quantidade de polissacarídeo extraído e não é indicado quando se pretende estudar a composição do mesmo (Matulewicz, 1996).

Tabela 4.1. Rendimento (%) de polissacarídeos de diferentes espécies de Gracilariaceae.

Espécie	Rendimento dos polissacarídeos (%)	Referência
<i>Gracilaria birdiae</i>	32,0 - 47,5	Ursi, 2005
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	27,3	Marinho-Soriano & Bourret, 2003
<i>Gracilaria domingensis</i>	35,4	Yoshimura, 2006
<i>Gracilaria dura</i>	32,0 - 35,0	Marinho-Soriano & Bourret, 2005
<i>Gracilaria edulis</i>	24,0	Meena <i>et al.</i> , 2008
<i>Gracilaria foliifera</i>	22,0	Meena <i>et al.</i> , 2008
<i>Gracilaria gracilis</i>	25,8	Marinho-Soriano & Bourret, 2003
<i>Gracilariopsis longissima</i>	12,2 - 16,5	Mollet <i>et al.</i> , 1998
<i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	21,1 - 31,1	Matsubara, 1997
	16,3 - 22,4	Zecchin <i>et al.</i> , 2000
	28,5 - 34,5	Presente trabalho

Apesar de não ter havido diferenças entre os tratamentos quanto ao rendimento dos polissacarídeos, foi constada correlação negativa entre rendimento e conteúdo tecidual de nitrogênio (Figura 4.25). Este resultado está de acordo com o observado para *G. bursa-pastoris* (Marinho-Soriano & Bourret, 2003), mas difere do verificado para *G. gracilis* (Marinho-Soriano & Bourret, 2003) e *G. dura* (Marinho-Soriano & Bourret, 2005), nas quais não houve correlação entre esses parâmetros. Além disso, foi observada correlação positiva entre rendimento e razão C:N (Figura 4.26), visto que a razão C:N variou apenas em função do conteúdo de nitrogênio (Figura 4.23).

Também não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação ao conteúdo de carboidrato total e de sulfato presente nos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons*. O teor de carboidratos (Figura 4.27) foi semelhante aos valores verificados para *G. birdiae* (Ursi, 2005). O teor de sulfato foi inferior (Figura 4.28) aos valores reportados para outras espécies de agarófitas, como *G. birdiae* (Ursi, 2005) e *G. gracilis* (Marinho-Soriano &

Bourret, 2003). Este resultado pode indicar uma melhor qualidade do ágar produzido por *Gp. tenuifrons*, em comparação com outras espécies da família, pois se considera que um menor conteúdo de sulfato esteja relacionado a géis de maior força (Armisen, 1995; Mollet *et al.*, 1998; Meena, 2008; Orduña-Rojas *et al.*, 2008).

4.4.3.2. Ressonância magnética nuclear de carbono 13 e de prótons

Com o intuito de avaliar a estrutura dos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons*, primeiramente foi obtido um espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN-¹³C) dos polissacarídeos de algas mantidas sob as mesmas condições do cultivo estoque.

Os sinais em 101,87 e 97,79 ppm correspondem ao C-1 de β-D-galactopiranosose (6-*O*-metilado ou não substituído neste carbono) ligado a 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose (Figura 4.29). Os sinais menores em 102,99 e 100,54 ppm correspondem ao C-1 de β-D-galactopiranosose ligado à α-L-galactopiranosose-6-sulfato (precursor da 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose) (Figura 4.29) (Nomura *et al.*, 1998; Falshaw *et al.*, 1999; Ducatti, 2005). O sinal em 67,04 ppm corresponde ao C-6 da unidade β-D-galactopiranosose substituída por grupo *O*-sulfato (Figura 4.29) (Valiente *et al.*, 1992). Portanto, a estrutura básica do ágar de *Gp. tenuifrons* é semelhante à de outras Gracilariaceae (Falshaw *et al.*, 1999; Guimarães, 2000; Ursi, 2005).

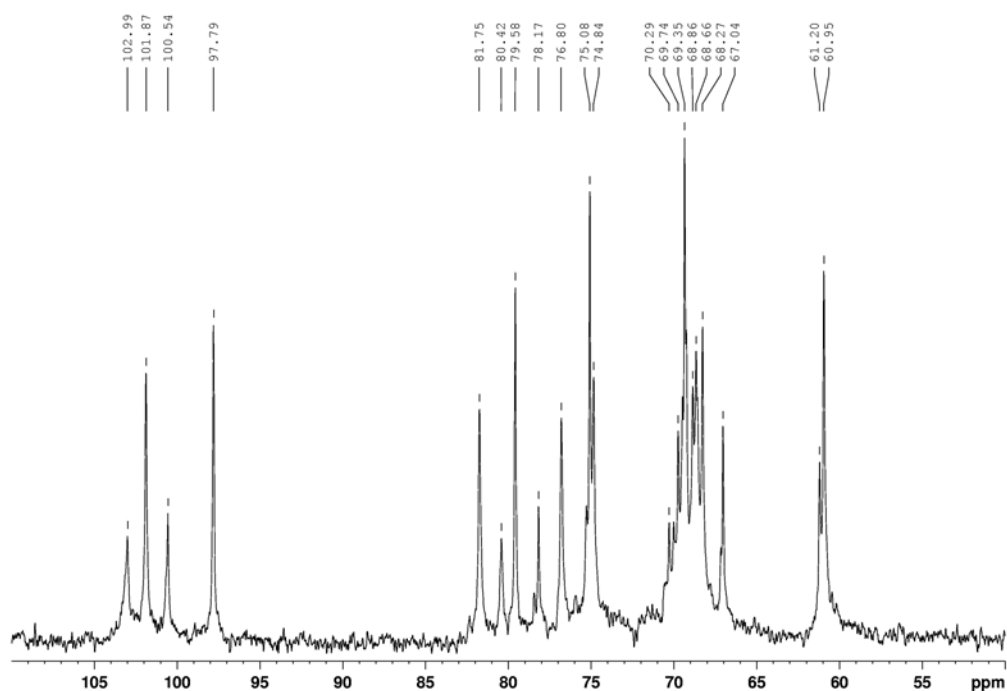


Figura 4.29. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C dos polissacarídeos extraídos de *Gracilariopsis tenuifrons* mantida nas condições do cultivo estoque.

Em seguida, foram obtidos os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN- ^1H) dos polissacarídeos de *Gp. tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato. Para cada réplica de cada tratamento foi obtido um espectro, perfazendo um total de 12. Porém, como os espectros exibiram perfis semelhantes, apenas um representativo das amostras é apresentado aqui (Figura 4.30).

O sinal em 5,37 ppm corresponde ao H-1 das unidades de α -D-glucose, indicando que o amido das florídeas está presente nos polissacarídeos extraídos (Ducatti, 2005). Os sinais em 5,31 e 5,16 ppm correspondem ao H-1 de α -L-galactopiranosose-6-sulfato e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, respectivamente (Zhang *et al.*, 2004). O sinal em 5,24 é atribuído ao H-1 de resíduos de α -L-galactopiranosose adjacentes a resíduos de galactose piruvatada (Mazumder *et al.*, 2002).

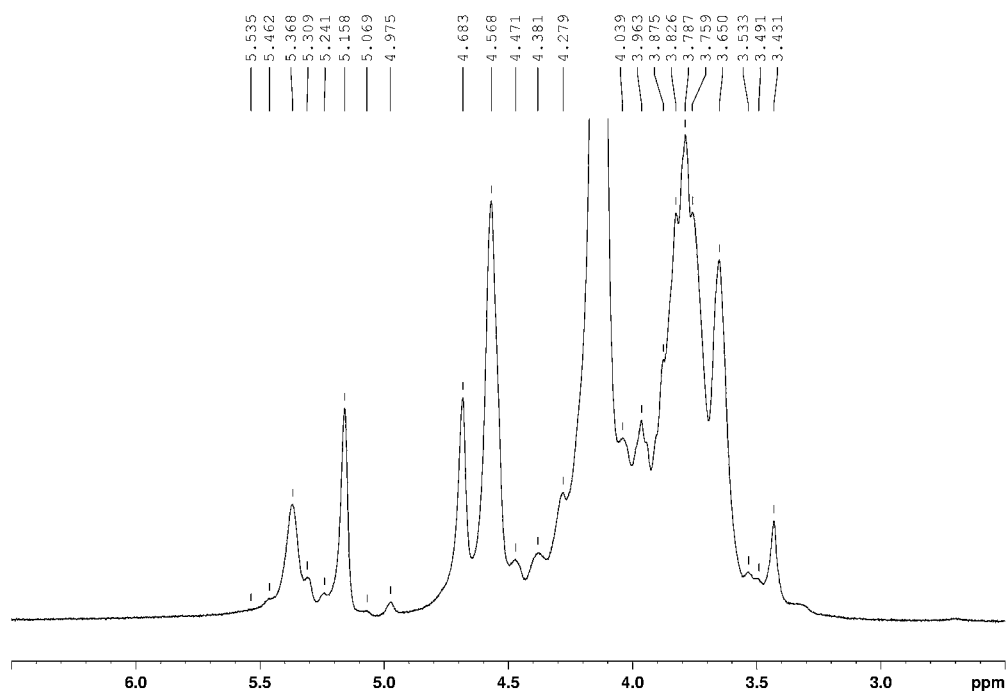


Figura 4.30. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H dos polissacarídeos extraídos de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo.

As áreas dos picos relativos ao amido das florídeas e às unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (3,6-AG), α -L-galactopiranosose-6-sulfato (precursor) e resíduos de α -L-galactopiranosose foram integradas. A partir desses dados, foi calculada a razão entre amido e (3,6-AG + precursor) dos polissacarídeos extraídos das algas submetidas às diferentes condições de nitrato.

As algas cultivadas em VS-N 50% apresentaram razão amido:(3,6-AG + precursor) próxima a 3,0 (Figura 4.31). As algas mantidas em meio com adição de 50 ou 150 μM de nitrato exibiram os menores valores de razão amido:(3,6-AG + precursor), cerca de 1,7, os quais foram semelhantes entre si ($p = 0,5908$) (Figura 4.31). As algas cultivadas sob o tratamento com 250 μM de nitrato apresentaram o maior valor de razão amido:(3,6-AG + precursor), aproximadamente 3,5 (Figura 4.31).

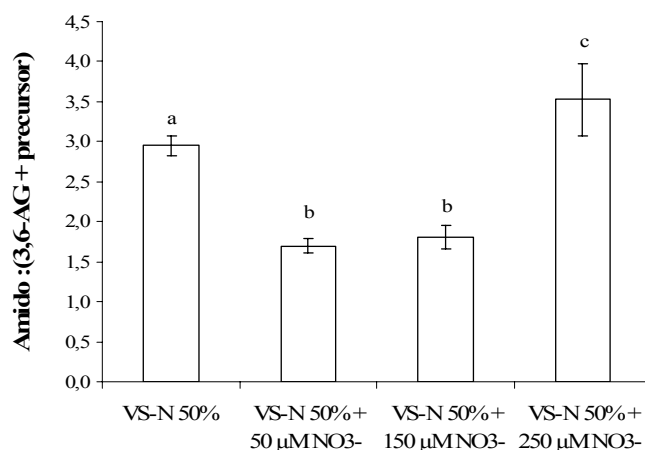


Figura 4.31. Razão amido:(3,6-AG + precursor) do polissacarídeo de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo (n = 3). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os dados de conteúdo tecidual de nitrogênio e razão amido:(3,6-AG + precursor) de todos os tratamentos foram usados para avaliar a existência de correlação entre esses parâmetros. Foi observada correlação negativa entre os parâmetros ($p = 0,0050$), com um coeficiente de correlação de Pearson (r) de -0,8034 para o conjunto de dados (Figura 4.32).

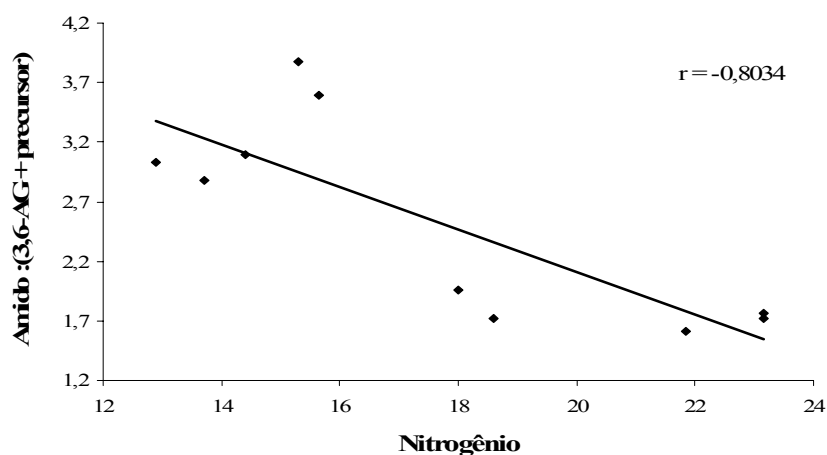


Figura 4.32. Correlação entre nitrogênio tecidual e razão amido:(3,6-AG + precursor) dos polissacarídeos de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

As razões C:N e amido:(3,6-AG + precursor) de todos os tratamentos foram utilizadas para efetuar-se a correlação entre essas duas variáveis. Foi observada correlação

positiva entre os parâmetros ($p = 0,0120$), com um coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,7537 para o conjunto de dados (Figura 4.33).

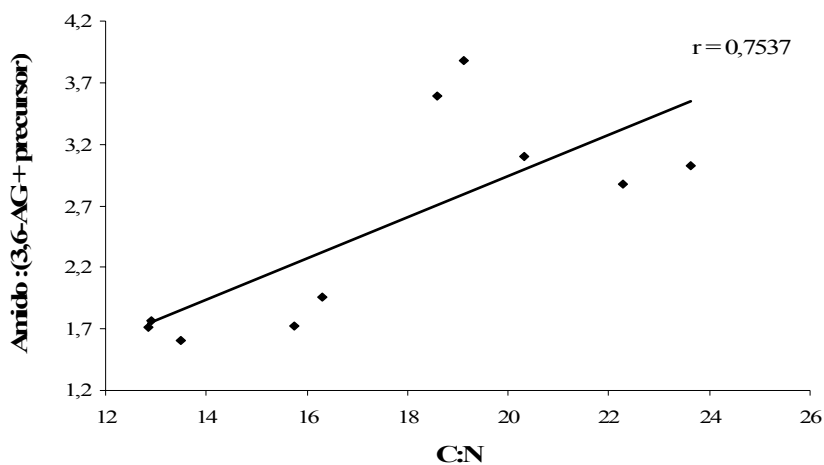


Figura 4.33. Correlação entre razão C:N e razão amido:(3,6-AG + precursor) dos polissacarídeos de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato por 28 dias, na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo. Cada ponto representa as medidas para uma mesma réplica. É apresentado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é provavelmente o método mais efetivo para analisar a estrutura dos polissacarídeos das algas vermelhas (Usov, 1992; Murano, 1995). A combinação de RMN- ^{13}C e ^1H permite uma rápida caracterização da estrutura primária dos polissacarídeos e a quantificação de contaminantes, como amido das florídeas (Murano, 1995).

O espectro de RMN- ^{13}C (Figura 4.29) apresentou sinais característicos de uma estrutura básica de agarana, a qual é composta por cadeias lineares alternando unidades de (1 \rightarrow 3) β -D-galactopiranosose e (1 \rightarrow 4) 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (3,6-AG; Figura 1.1), sendo que esta última unidade também está na forma de α -L-galactopiranosose-6-sulfato, seu precursor bioquímico (Mollet *et al.*, 1998; Falshaw *et al.*, 1999; Lahaye, 2001, Ursi, 2005).

Os sinais correspondentes às unidades constituintes das agaranas observadas no espectro de RMN- ^{13}C também foram reconhecidos nos espectros de RMN- ^1H , além do pico referente ao amido das florídeas (Figura 4.30). A presença de amido nos polissacarídeos das algas submetidas a diferentes concentrações de nitrato possivelmente deveu-se ao fato de que as extrações dessas amostras foram realizadas em água quente, a 90 °C (Lahaye & Yaphe, 1989), o que aumentaria a solubilidade dos polissacarídeos (Matsubara, 1997).

Após a integração dos picos verificados nos espectros de RMN-¹H foi possível calcular a razão entre amido e (3,6-AG + precursor). Os polissacarídeos das algas cultivadas em meio com acréscimo de 50 ou 150 μM de nitrato apresentaram os menores valores de razão amido:(3,6-AG + precursor), próximos a 1,7 (Figura 4.31), sendo que essas algas apresentaram os maiores teores de nitrogênio tecidual (Figura 4.22c). As algas mantidas em VS-N 50% apresentaram valores intermediários aos demais tratamentos quanto ao teor de nitrogênio e à razão amido:(3,6-AG + precursor) dos polissacarídeos (Figuras 4.22c e 4.31). Já as algas cultivadas em meio com adição de 250 μM de nitrato exibiram o menor conteúdo tecidual de nitrogênio e seus polissacarídeos apresentaram a maior razão amido:(3,6-AG + precursor), aproximadamente 3,5 (Figuras 4.22c e 4.31).

Dessa forma, foi observada correlação negativa entre razão amido:(3,6-AG + precursor) e conteúdo de nitrogênio (Figura 4.32), além de correlação positiva entre razão amido:(3,6-AG + precursor) e razão C:N (Figura 4.33), uma vez que a razão C:N variou apenas em função do conteúdo de nitrogênio (Figura 4.23).

A reduzida TC exibida pelas algas cultivadas em VS-N 50% (Figura 4.20), a maior porcentagem de massa seca (Figura 4.21) e o baixo conteúdo tecidual de nitrogênio (Figura 4.22c) indicariam o consumo das reservas intracelulares deste composto e o acúmulo de polissacarídeos de reserva, como o amido das florídeas (Collén *et al.*, 2004). Isto estaria de acordo com a razão entre amido e (3,6-AG + precursor) observada nesse tratamento, que foi cerca de 3,0 (Figura 4.31).

A baixa TC apresentada pelas algas cultivadas em meio com adição de 50 μM de nitrato, semelhante àquela das algas mantidas em VS-N 50% (Figura 4.20), e o maior conteúdo tecidual de nitrogênio (Figura 4.22c) poderiam indicar que as algas acumulariam substâncias nitrogenadas, como proteínas, em detrimento do crescimento. Com isso, a síntese de parede celular seria favorecida sobre a produção de protoplasto (Araño *et al.*, 2000). Isto poderia explicar a menor razão entre amido e (3,6-AG + precursor) presente nos polissacarídeos extraídos das algas mantidas em meio com acréscimo de 50 μM de nitrato, cujo valor foi aproximadamente 1,7 (Figura 4.31).

As algas cultivadas em meio com suplemento de 150 μM de nitrato apresentaram valores de TC e teor de nitrogênio intermediários aos demais tratamentos (Figuras 4.20 e 4.22c). Nesta condição, tanto o acúmulo de compostos nitrogenados quanto o crescimento seriam favorecidos e, portanto, haveria menor reserva de amido. Isto pode ser observado na razão entre amido e (3,6-AG + precursor) presentes nos polissacarídeos dessas algas, cujo valor também foi cerca de 1,7 (Figura 4.31).

As algas mantidas em meio com adição de 250 μM de nitrato exibiram as maiores TCs (Figura 4.20), o que poderia ter ocasionado a diluição do nitrogênio presente nas algas, uma vez que foi observado um baixo conteúdo de nitrogênio neste tratamento (Figura 4.22c) (McGlathery *et al.*, 1996; Fong *et al.*, 2004; Teichberg *et al.*, 2007). Neste caso, haveria um menor acúmulo de compostos nitrogenados e, portanto, os esqueletos carbônicos poderiam ser deslocados para a síntese de polissacarídeos de reserva, como amido das florídeas. Isto estaria de acordo com a razão entre amido e (3,6-AG + precursor) observada nesse tratamento, que foi aproximadamente 3,5 (Figura 4.31).

Diversos trabalhos reportam um maior rendimento de polissacarídeos em algas sob limitação de nitrogênio (DeBoer, 1978; Bird *et al.*, 1981; Marinho-Soriano, 1999; Marinho-Soriano & Bourret, 2003). Porém, considerando-se os resultados apresentados no presente trabalho, é provável que este maior rendimento deva-se à presença de amido dentre os polissacarídeos extraídos.

Por outro lado, poucos são os estudos que avaliam o conteúdo de nitrogênio tecidual (Marinho-Soriano & Bourret, 2003; 2005), o que poderia fornecer dados relevantes para a compreensão do metabolismo da alga. Em *Gp. tenuifrons*, foi observada correlação negativa entre rendimento de polissacarídeos e conteúdo tecidual de nitrogênio, assim como em *G. bursa-pastoris* (Marinho-Soriano, 1999; Marinho-Soriano & Bourret, 2003). No entanto, em *G. gracilis* e *G. dura*, não foi constatada correlação entre rendimento dos polissacarídeos e nitrogênio tecidual (Marinho-Soriano & Bourret, 2003; 2005). Em *Gp. tenuifrons*, também foi verificada correlação positiva entre conteúdo de 3,6-AG e de nitrogênio (o que pode ser inferido indiretamente a partir da correlação entre razão amido:(3,6-AG + precursor) e nitrogênio). Este fato também foi reportado para *G. dura* (Marinho-Soriano & Bourret, 2005), mas difere do observado para *G. bursa-pastoris* e *G. gracilis*, nas quais não houve correlação (Marinho-Soriano & Bourret, 2003).

Como os tratamentos foram semelhantes quanto ao rendimento dos polissacarídeos, aqueles com adição de 50 ou 150 μM de nitrato ao meio de cultivo seriam mais interessantes para a produção de ágar em *Gp. tenuifrons*, nas condições de experimentação empregadas neste trabalho, uma vez que a razão entre amido e (3,6-AG + precursor) foi menor nesses tratamentos, indicando uma maior porcentagem de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose e α -L-galactopirranose-6-sulfato nos polissacarídeos extraídos.

5. Considerações Finais

5. Considerações Finais

O presente estudo avaliou as respostas fisiológicas e bioquímicas de *Gracilariopsis tenuifrons* cultivada em diferentes condições de nitrato, sendo um dos poucos trabalhos que abordam o metabolismo do nitrogênio nesta rodófito.

Em relação ao crescimento, atividade da NR, composição química e captação de nitrato e fosfato em *Gp. tenuifrons*, pôde-se concluir que:

i) É necessário estabelecer a proporção de massa fresca de material por volume de meio de cultivo em estudos fisiológicos e bioquímicos, uma vez que isto pode ser determinante nas respostas apresentadas pelo organismo, em curto e longo prazo;

ii) Nas algas cultivadas na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, o crescimento máximo foi atingido na concentração de 150 μM , indicando limitação de outro nutriente ou luz ao crescimento da espécie. Porém, a limitação por fosfato foi descartada, uma vez que os dados de remoção de nutrientes mostraram que ainda havia fosfato remanescente no meio de cultivo após uma semana;

iii) Nas algas cultivadas na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, as taxas de crescimento foram inferiores às observadas nas algas cultivadas na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, provavelmente devido à maior densidade de algas nos frascos de cultivo, o que atenuaria a irradiância recebida por elas devido ao sombreamento dos talos contidos no frasco e, conseqüentemente, reduziria a taxa fotossintetizante, e à menor proporção de nitrato disponível para cada grama de alga;

iv) Nas duas condições de massa fresca por litro de meio de cultivo, o conteúdo tecidual de carbono e a razão C:N diminuíram com o incremento da concentração de nitrato, possivelmente em resposta à assimilação do nitrogênio, que estimularia o fluxo de carbono através das rotas glicolíticas e respiratórias, evitando seu acúmulo como amido das florídeas ou floridosídeo;

v) Nas algas mantidas na proporção de 1 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, o conteúdo tecidual de nitrogênio aumentou de acordo com a disponibilidade de nitrato no meio de cultivo, devido ao acúmulo de pigmentos fotossintetizantes (ficobiliproteínas e clorofila *a*), proteínas solúveis e, provavelmente, outros compostos nitrogenados;

vi) Nas algas mantidas na proporção de 10 g de massa fresca por 1 L de meio de cultivo, o conteúdo de nitrogênio foi maior nas algas mantidas em meio com adição de 50 μM de nitrato e diminuiu gradativamente à adição de nitrato do meio, provavelmente devido à diluição do nitrogênio com o crescimento das algas;

vii) A razão C:N seria um bom indicador do estado nutricional de *Gp. tenuifrons*, assim como a análise conjunta da concentração de proteínas solúveis, ficobiliproteínas e clorofila *a*;

viii) Não foi observada saturação na taxa de captação de nitrato, a qual não estava relacionada à taxa de captação de fosfato;

iv) A atividade da NR foi maior nas algas cultivadas em meio com 50 μM de nitrato. Nos tratamentos sem nitrato ou com acréscimo de 250, 500 ou 750 μM de nitrato, os valores de atividade da NR foram baixos e semelhantes entre si. Estes resultados não foram condizentes com a taxa de crescimento e o conteúdo tecidual de nitrogênio, os quais refletiriam o metabolismo de nitrogênio. Foi sugerida a hipótese de que o acúmulo de substâncias nitrogenadas pelas algas submetidas aos tratamentos com maior disponibilidade de nitrato poderia desencadear um mecanismo de *feedback* negativo sobre a atividade da NR, inativando-a temporariamente e fazendo com que as algas apresentassem uma baixa atividade enzimática. Submetendo-se as algas cultivadas em meio com adição de 250 μM de nitrato a uma elevada irradiância, foi observado aumento da atividade da NR após 10 min, corroborando a hipótese sugerida. Durante o período de cultivo das algas foi constatado que quase todo o nitrato adicionado ao meio era captado ao final de cada semana sugerindo que as reservas intracelulares de nitrato são consumidas no decorrer da semana para sustentar o crescimento da alga. Portanto, em *Gp. tenuifrons* é provável que a atividade da NR esteja relacionada ao acúmulo de compostos nitrogenados e ao estoque intracelular de nitrato;

v) A estrutura básica do ágar de *Gp. tenuifrons* é semelhante à de outras Gracilariaceae;

vi) As algas com maior conteúdo tecidual de nitrogênio seriam mais interessantes para a produção de ágar, uma vez que não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação ao rendimento de polissacarídeos e foi observada correlação negativa entre conteúdo tecidual de nitrogênio e razão amido:(3,6-anidro- α -L-galactopiranosose + α -L-galactopiranosose-6-sulfato).

Além disso, algumas sugestões para trabalhos futuros seriam:

i) Análise da captação de nitrato todos os dias ao longo de uma semana para avaliar se apenas uma renovação semanal de meio de cultivo é suficiente para sustentar o máximo crescimento da alga;

ii) Avaliação do conteúdo tecidual de fósforo, uma vez que a razão N:P também é importante para determinar as respostas fisiológicas do organismo;

iii) Testes com outras fontes de carbono para analisar a relação entre a disponibilização de esqueletos carbônicos e a atividade da NR;

iv) Realização de imunoenaios para a detecção da enzima NR nos tratamentos com maior disponibilidade de nitrato, em que a atividade enzimática foi baixa;

v) Avaliação do rendimento do ágar nas algas mantidas na proporção de 1 g por 1 L de meio de cultivo, visto que nessa condição as diferenças entre os tratamentos foram mais evidentes.

6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- ANDRIA, J.R., VERGARA, J.J. & LLORENS, L.P. 1999. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *Eur. J. Phycol.* 34: 497-504.
- ARAÑO, K.G., TRONO JR, G.C., MONTAÑO, N.E., HURTADO, A.Q. & VILLANUEVA, R.D. 2000. Growth, agar yield and quality of selected agarophyte species from the Philippines. *Bot. Mar.* 43: 517-524.
- ARMISEN, R. 1995. World-wide use and importance of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7: 231-243.
- BARR, N.G. & REES, T.A.V. 2003. Nitrogen status and metabolism in the green seaweed *Enteromorpha intestinalis*: an examination of three natural populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249: 133-144.
- BEER, S. & ESHEL, A. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 36(6): 785-792.
- BELLORIN, A.M., OLIVEIRA, M.C. & OLIVEIRA, E.C. 2002. Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on small subunit rDNA and its sequences of Atlantic and Pacific species. *J. Phycol.* 38: 552-563.
- BELLORIN, A.M., BURIYO, A., SOHRABIPOUR, J., OLIVEIRA, M.C. & OLIVEIRA, E.C. 2008. *Gracilariopsis mclachlanii* sp. nov. and *Gracilariopsis persica* sp. nov. of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyceae) from the Indian ocean. *J. Phycol.* 44: 1022-1032.
- BERGES, J.A. 1997. Algal nitrate reductases. *Eur. J. Phycol.* 32: 3-8.
- BIRD, K.T., HANISAK, M.D. & RYTHER, J. 1981. Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions. *Bot. Mar.* 24: 441-444.
- BIRD, K.T., HABIG, C. & DEBUSK, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18: 344-348.
- BIRD, C.J. & OLIVEIRA, E.C. 1986. *Gracilaria tenuifrons* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta), a species from the tropical western Atlantic with superficial spermatangia. *Phycologia* 25: 313-320.

- BRADFORD, M. 1976. A rapid sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRAGA, E.S. 1997. Determinação automática de nitrato. *In: WAGENER, A.R. & CARREIRA, R. (eds). MÉTODOS ANALÍTICOS DE REFERÊNCIA EM OCEANOGRAFIA QUÍMICA.* Rio de Janeiro, REVIZEE, MMA, SMA. 1ª ed. pp 31-35.
- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. 2000. *BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS.* Am. Soc. Plant Physiol., USA. 1367 p.
- CAMPBELL, W.H. 2001. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 194-204.
- 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 University Press, Cambridge. pp 196-202.
- CHIRAPART, A. & OHNO, M. 1993. Seasonal variation in the physical properties of agar and biomass of *Gracilaria* sp. (*chorda* type) from Tosa Bay, Southern Japan. *Hydrobiologia* 260/261: 541-547.
- CHOPIN, T., BUSCHMANN, A.H., HALLING, C., TROELL, M., KAUTSKY, N., NEORI, A., KRAEMER, G.P., ZERTUCHE-GONZÁLEZ, J.A., YARISH, C. & NEEFUS, C. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J. Phycol.* 37: 975-986.
- CHOW, F. 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 136 p.
- CHOW, F., MACCHIAVELLO, J., SANTA-CRUZ, S., FONCK, E & OLIVARES, J. 2001. Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters and sea urchins. *J. World Aquac. Soc.* 32: 215-220.
- CHOW, F., YOKOYA, N.S., NAKABASHI, M., HERNANDES, M.H, VAN-SLUYS, M. A. & OLIVEIRA, M. C. 2004a. Transient genetic transformation of the agarophyte *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) using *gus* reporter gene by biobalistic method. *In: XVIII International Seaweed Symposium, Bergen. Proceeding of XVIII International Seaweed Symposium.*

- CHOW, F., OLIVEIRA, M.C. & PEDERSÉN, M. 2004b. *In vitro* assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. J. Plant Physiol. 161: 769-776.
- CHOW, F., CAPOCIAMA, F.V., FARIA, R. & OLIVEIRA, M.C. 2007. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). Rev. Bras. Bot. 30: 123-129.
- CHOW, F. & OLIVEIRA, M.C. 2008. Rapid and slow modulation of nitrate reductase activity in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta): influence of different nitrogen sources. J. Appl. Phycol. 20: 775-782.
- COHEN, R.A. & FONG, F. 2004. Nitrogen uptake and assimilation in *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link (Chlorophyta): using ¹⁵N to determine preference during simultaneous pulses of nitrate and ammonium. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 309: 67-77.
- COLLÉN, P.N., CAMITZ, A. HANCOCK, R.D., VIOLA, R. & PEDERSÉN, M. 2004. Effect of nutrient deprivation and resupply on metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J. Phycol. 40: 305-314.
- CORZO, A. & NIEL, F.X. 1991. Determination of nitrate reductase activity in *Ulva rigida* C. Agardh by the *in situ* methods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 146: 181-191.
- COSTA, V.L. 2005. Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 100 p.
- CRAWFORD, N.M. 1995. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell 7: 859-868.
- CRAWFORD, N.M. & ARST, H.N. 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. Annu. Rev. Genet. 27: 115-146.
- CRAWFORD, N.M. & GLASS, A.D.M. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends Plant Sci. 3(10): 389-395.
- CRITCHLEY, A.T. 1993. *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta): an economically important agarophyte. In: OHNO, M & CRITCHLEY, A.T. (eds). SEAWEED CULTIVATION AND MARINE RANCHING. JICA, Yokosuka, Japan. pp 89-112.
- DAVISON, I.R. & STEWART, W.D.P. 1984. Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. II. The role of nitrate availability in the regulation of enzyme activity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 79: 65-78

- DEBOER, J.A. 1978. Effects of nitrogen enrichment on growth rate and phycocolloid content in *Gracilaria foliifera* and *Neogardhiella baileyi* (Florideophyceae). Proc. Intl. Seaweed Symp. 9: 263- 269.
- DEBOER, J.A., GUIGLI, H.J., ISRAEL, T.L. & D'ELIA, C.F. 1978. Nutritional studies of two red algae. I. Growth rate as a function of nitrogen source and concentration. J. Phycol. 14: 261-266.
- DE LA ROSA, M.A., RONCEL, M. & NAVARRO, J.A. 1989. Flavin-mediated photoregulation of nitrate reductase: a key point of control in inorganic nitrogen photosynthetic metabolism. Bioelectrochem. Bioenerg. 22: 355-364.
- D'ELIA, C.F. & DEBOER, J.A. 1978. Nutritional studies of two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. J. Phycol. 14: 266-272.
- DE MARSAC, N.T., MAZEL, D., DAMERVAL, T., GUGLIELMI, G., CAPUANO, V. & HOUMARD, J. 1988. Photoregulation of gene expression in the filamentous cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601: light-harvesting complexes and cell differentiation. Photosyn. Res. 18: 99-132.
- DENG, M.T., MOUREAUX, T., LEYDECKER, M. & CABOCHE, M. 1990. Nitrate reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotina tabacum* leaves. Planta 180: 257-261.
- DOGSON, K.S. 1961. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymatic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. Biochem. J. 78: 312-319.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A. HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- DUCATTI, D.R.B. 2005. Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas: estudos de ressonância magnética nuclear. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 113 p.
- DUKE, S.H. & DUKE, S.O. 1984. Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plants. Physiol. Plant. 62: 485-493.
- EDWARDS, P. 1970. ILLUSTRATED GUIDE TO THE SEAWEEDS AND SEA GRASSES IN THE VICINITY OF PORTO ARANSAS, TEXAS. Contr. Mar. SC, Austin 15: 1-228.
- FALKOWSKI, P.G. 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. Nature 387: 272-275.

- FALSHAW, R., FURNEAUX, R.H., PICKERING, T.D. & STEVENSON, D.E. 1999. Agars from three Fijian *Gracilaria* species. *Bot. Mar.* 42: 51-59.
- FERREIRA, L.B. 2008. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 200 p.
- FONG, P., BOYER, K.E., KAMER, K. & BOYLE, K.A. 2003. Influence of initial tissue nutrient status of tropical marine algae on response to nitrogen and phosphorus additions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 262: 111-123.
- FONG, P., FONG, J.J. & FONG, C.R. 2004. Growth, nutrient storage and release of dissolved inorganic nitrogen by *Enteromorpha intestinalis* in response to pulses of nitrogen and phosphorus. *Aquat. Bot.* 78: 83-95.
- FREILE-PELEGRÍN, Y. & ROBLEDO, D. 1997. Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, México. *J. Appl. Phycol.* 9: 533-539.
- GAO, Y., SMITH, G.J. & ALBERTE, R.S. 1992. Light regulation of nitrate reductase in *Ulva fenestrata* (Chlorophyceae). I. Influence of light regimes on nitrate reductase activity. *Mar. Biol. (Berlin)* 112: 691-696.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M.J., FERNÁNDEZ, J.A. & NIELL, F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plant.* 88: 631-637.
- GEIDER, R.J. & LA ROCHE, J. 2002. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 37(1): 1-17.
- GIORDANO, M., CHEN, Y., KOBLIZEK, M. & FALKOWSKI, P.G. 2005. Regulation of nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii* by the redox state of the plastoquinone pool. *Eur. J. Phycol.* 40: 345-352.
- GLASS, A.D.M. 2003. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22(5): 453-470.
- GLAZER, A.N. 1982. Phycobilisomes: Structure and dynamics. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 173-198.
- GRANBOM, M., CHOW, F., LOPES, P.F., OLIVEIRA, M.C., COLEPICCOLO, P., PAULA, E.J. & PEDERSÉN M. 2004. Characterization of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *Aquat. Bot.* 78: 295-305.
- GRASSHOFF, K., ENHARDT, M. & KREMLING, K. 1983. *Methods of sea water analysis.* Verlag Chemie, Weinheim. 419 p.

- GUIMARÃES, M. 2000. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 89 p.
- GURGEL, A.F.D., LIAO, L.M., FREDERICQ, S. & HOMMERSAND, M.H. 2003. Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence. *J. Phycol.* 39: 154-171.
- HAGLUND, K. & PEDERSÉN, M. 1993. Outdoor pond cultivation of the subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte control. *J. Appl. Phycol.* 5: 271-284.
- HANISAK, D. 1990. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system the understanding the nitrogen nutrition of culture seaweeds. *Hydrobiologia* 204/205: 79-87.
- HARRISON, P.J., DRUEHL, L.D., LLOYD, K.E. & THOMPSON, P.A. 1986. Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groenlandica* (Laminariales, Phaeophyta). *Mar. Bot.* 93: 29-35.
- HERNÁNDEZ, I., FERNÁNDEZ-ENGO, M.A., PÉREZ-LORÉNS, J.L. & VERGARA, J.J. 2005. Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus aurata* waste waters. *J. Appl. Phycol.* 17: 557-567.
- HERNÁNDEZ, I., PÉREZ-PASTOR, A., VERGARA, J.J., MARTÍNEZ-ARAGÓN, J.F., FERNÁNDEZ-ENGO, M.A. & PÉREZ-LORÉNS, J.L. 2006. Studies on the biofiltration capacity of *Gracilariopsis longissima*: from microscale to macroscale. *Aquaculture* 252: 43-53.
- HO, T.Y., QUIGG, A., FINKEL, Z.V., MILLIGAN, A.J., WYMAN, K., FALKOWSKI, P.G. & MOREL, F.M.M. 2003. The elemental composition of some marine phytoplankton. *J. Phycol.* 39(6): 1145-1159.
- HOODA, P.S. 2008. Microbial and nutrient contaminants of fresh and coastal waters. *J. Environ. Manage.* 87: 533-534.
- HOODA, P.S., EDWARDS, A.C., ANDERSON, H.A. & MILLER, A. 2000. A review of catchment water quality concerns in livestock farming areas. *Sci. Total Environ.* 250: 143-167.
- HOSHAW, R.W. & RODOWSKI, J.R. 1973. Methods for the microscopic algae. *In*: STEIN, J.R. (ed). *HANDBOOK OF PHYCOLOGICAL METHODS. CULTURE METHODS AND GROWTH MEASUREMENTS*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p 53-68.

- HUPPE, H.C. & TURPIN, D.H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism on plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 45: 577-607.
- HWANG, S.P.L., WILLIAMS, S.L. & BRINKHUIS, B.H. 1987. Changes in internal dissolved nitrogen pools as related to nitrate uptake and assimilation in *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 30: 11-19.
- INSKEEP, W.P & BLOOM, P.R. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483-485.
- KAISER, W.M. & HUBER, S.C. 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52 (363): 1981-1989.
- KARL, D., LETELIER, R., TUPAS, L., DORE, J., CHRISTIAN, J. & HEBEL, D. 1997. The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 388: 533-538.
- KREGTING L.T., HURD, C.L., PILDITCH, C.A. & STEVENS, C.L. 2008. The relative importance of water motion on nitrogen uptake by the subtidal macroalga *Adamsiella chauvini* (Rhodophyta) in winter and summer. *J. Phycol.* 41: 320-330.
- KUMAR, G.R., REDDY, C.R.K., GANESAN, M., THIRUPPATHI, S., DIPAKKORE, S., ESWARAN, K., RAO, P.V.S. & JHA, B. 2004. Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 43(5): 596-602.
- KÜPPERS, J.A. & WEIDNER, M. 1980. Seasonal variation of enzyme activities in *Laminaria hyperborean*. *Planta* 148: 22-230.
- KURSAR, T.A., VAN DER MEER, J. & ALBERTE, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analysis of pigment mutations. *Plant Physiol.* 73: 353-360.
- LAHAYE, M. 2001. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J. Appl. Phycol.* 13: 173-184.
- LAHAYE, M. & YAPHE, W. 1989. The chemical structure of agar from *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville, *G. cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. damaecornis* J. Agardh and *G. domingensis* Sonder ex Kützing (Gigartinales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 32: 369-377.
- LAHAYE, M. & ROCHAS, C. 1991. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia* 221: 137-148.

- LAPOINTE, B.E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 17: 90-95.
- LAPOINTE, B.E. & DUKE, C.S. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* 20: 488-495.
- LAPOINTE, B.E., DAWES, C.J. & TENORE, K.R. 1984. Interactions between light and temperature on the physiological ecology of *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 80: 171-178.
- LARTIGUE, J. & SHERMAN, T.D. 2005. Response of *Enteromorpha* sp. (Chlorophyceae) to a nitrate pulse: nitrate uptake, inorganic nitrogen storage and nitrate reductase activity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 292: 147-157.
- LEWIN, J. 1966. Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatoms growth. *Phycologia* 6: 1-12.
- LI, S.Y., LELLOUCHE, J.P., SHABTAI, Y. & ARAD, S.M. 2001. Fixed carbon partitioning in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). *J. Phycol.* 37: 289-297.
- LIGNELL, A. & PEDERSÉN, M. 1989. Agar composition as function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 32: 219-227.
- LILLO, C. 1994. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* 90: 616-620.
- LILLO, C., MEYER, C., LEA, U.S., PROVAN, F. & OLTEDAL, S. 2004. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J. Exp. Bot.* 55 (401): 1275-1282.
- LOBBAN, C.S. & HARRISON, P.J. 1994. SEAWEED ECOLOGY AND PHYSIOLOGY. Cambridge University Press. Cambridge. pp 163-209.
- LOPES, P.F. 2001. Caracterização bioquímica e regulação da nitrato redutase na macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 163 p.
- LOPES, P.F., OLIVEIRA, M.C. & COLEPICOLO, P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 33: 225-231.

- LOPES, P.F., OLIVEIRA, M.C. & COLEPICOLA, P. 2002. Characterization and daily variation of nitrate reductase in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 50-54.
- LOURENÇO, S.O., BARBARINO, E., DE PAULA, J.C., PEREIRA, L.O.S. & MARQUEZ, U.M.L. 2002. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol. Res.* 50: 233-241.
- MARINHO-SORIANO, E. 1999. Biomass and agar yield of *Gracilaria bursa-pastoris* in a Mediterranean lagoon. *Seaweed Res. Utiln* 21 (1-2): 9-13.
- MARINHO-SORIANO, E. & BOURRET, E. 2003. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* 90: 329-333.
- MARINHO-SORIANO, E. & BOURRET, E. 2005. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* 96: 379-382.
- MARTINS, A.P. 2007. Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J.V. Lamour (Gigartinales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo. 118 p.
- MATSUBARA, R.M.S. 1997. Extração e propriedades físico-químicas do colóide de uma alga brasileira (*Gracilariopsis tenuifrons* – Rhodophyta) Tese de Mestrado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 80 p.
- MATULEWICZ, M.C. 1996. Polisacáridos de algas rojas. *In*: FERRARIO, M. & SAR, E. (eds). MACROALGAS DE INTERÉS ECONÓMICO. CULTIVO, MANEJO, INDUSTRIALIZACIÓN. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. pp 111-133.
- MAZUMDER, S., GHOSAL, P.K., PUJOL, C.A., CARLUCCI, M., DAMONTE, E.B. & RAY, B. 2002. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* 31: 87-95.
- MCGLATHERY, K.J., PEDERSEN, M.F. & BORUM, J. 1996. Changes in intracellular nitrogen pools and feedback controls on nitrogen uptake in *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 32: 393-401.
- MCHUGH, D.J. 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper nº 441. Roma. 105 p.
- MEENA, R., PRASAD, K., GANESAN, M. & SIDDHANTA, A.K. 2008. Superior quality agar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the Gulf of Mannar, India. *J. Appl.* 20: 397-402.

- MOLLET, J.C., RAHAOUI, A. & LEMOINE, Y. 1998. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *J. Appl. Phycol.* 10: 59-66.
- MOUTIN, T., VAN DEN BROECK, N., BEKER, B., DUPOUY, C., RIMMELIN, P. & LE BOUTEILLER, A. 2005. Phosphate availability controls *Trichodesmium* spp. biomass in the SW Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 297: 15-21.
- MURANO, 1995. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7: 245-254
- NALDI, M. & WHEELER, P.A. 1999. Changes in nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. *J. Phycol.* 35: 70-77.
- NALDI, M. & WHEELER, P.A. 2002. ¹⁵N measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and ¹⁵N accumulation in algal tissue. *J. Phycol.* 38: 135-144.
- NAVARRO-ANGULO, L. & ROBLEDO, D. 1999. Effects of nitrogen source, N:P ratio and N-pulse concentration and frequency on the growth of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) in culture. *Hydrobiologia* 398/399: 315-320.
- NISHIHARA, G.N., TERADA, R. & NORO, T. 2005. Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales). *J. Appl. Phycol.* 17: 371-377.
- NOMURA, K., NAITOH, Y., MURAMATSU, S., YOSHIKAWA, Y., TSUNEHIRO, J., FUKUI, F. & ITOH, M. 1998. New sulfated oligosaccharides produced by *Pseudomonas* β -agarase from *Gracilaria verrucosa* polysaccharide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1190-1195.
- OLIVEIRA, E.C. 1998. The seaweed resources of Brazil. *In: CRITCHLEY, A.T. & OHNO, M. (eds). SEAWEED RESOURCES OF THE WORLD.* JICA, Yokosuka. pp 366-371.
- OLIVEIRA, E.C. & PLASTINO, E.M. 1994. Gracilariaceae. *In: AKATSUKA, I. (ed). BIOLOGY OF ECONOMIC ALGAE.* SPB Academic Publishing. pp 185-226.
- OLIVEIRA, E.C., PAULA, E.J., PLASTINO, E.M. & PETTI, R. 1995. Metodologías para el cultivo no axénico de macroalgas marinas *in vitro*. *In: ALVEAL, K., FERRARIO, M.E., OLIVEIRA, E.C. & SAR, E. (eds). MANUAL DE MÉTODOS FICOLÓGICOS.* Universidad de Concepción, Concepción, Chile. pp 429-447.

- OLIVEIRA, E.C. & MIRANDA, G.E.C. 1998. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. Anais do IV Congresso Latino Americano de Ficologia, II Reunião ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia. v 2: 149-156.
- OLIVEIRA, E.C., ALVEAL, K., & ANDERSON, R.J. 2000. Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. Rev. Fish. Sci. 8(4): 345-377.
- ORDUÑA-ROJAS, J., GARCÍA-CAMACHO, K.Y., OROZCO-MEYER, P., RÍOSMENA-RODRÍGUEZ, R., PACHECO-RUIZ, I., ZERTUCHE-GONZÁLEZ, J.A. & MELING-LÓPEZ, A.E. 2008. Agar properties of two species of Gracilariaceae from the Gulf of California, Mexico. J. Appl. Phycol. 20: 169-175.
- PEDERSÉN, M.F. 1994. Transient ammonium uptake in the macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta): nature, regulation and the consequences for choice of measuring technique. J. Phycol. 30(6): 980-986.
- PEREIRA, R., YARISH, C. & SOUSA-PINTO, I. 2006. The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). Aquaculture 252: 66-78
- PLASTINO, E.M. 1991. Cultivo *in vitro*. Estudos reprodutivos e biossistemática de algas gracilarióides (Rhodophyta, Gracilariales) de talo cilíndrico. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 170 p.
- PLASTINO, E.M., URSI, S. & HEIMBECKER, A.M.C. 1998. Efeito da temperatura e salinidade no crescimento de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). In: Anais do IV Congresso Latino-americano de Ficologia. Caxambu, MG. v 2: 359-369.
- PLASTINO, E.M. & OLIVEIRA, E.C. 2002. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with terete frond and deep spermatangial conceptacles. Phycology 41: 389-396.
- PORRA, R.J., PFÜNDEL, E.E. & ENGEL, N. 1997. Metabolism and function of photosynthetic pigments. In: JEFFREY, S.W., MANTOURA & WRIGHT, S.W. (eds). PHYTOPLANKTON PIGMENTS IN OCEANOGRAPHY: GUIDELINES TO MODERN METHODS. Unesco. pp 85-126.
- REES, T.A.V., DOBSON, B.C., BIJL, M. & MORELISSSEN, B. 2007. Kinetics of nitrate uptake by New Zealand marine macroalgae and evidence for two nitrate transporters in *Ulva intestinalis* L. Hydrobiologia 586: 135-141.
- RENN, D. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. Trends Biotechnol. 15: 9-14.

- ROBAINA, R.R., GARCIA, P., GARCIA-REINA, G. & LUQUE, A. 1990. Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. J. Appl. Phycol. 2: 137-143.
- ROSSA, M.M. 1999. A luz como fator de regulação da atividade enzimática da nitrato redutase (NR) e superóxido dismutase (SOD) em *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 109 p.
- ROSSA, M.M., OLIVEIRA, M.C., OKAMOTO, O.K., LOPES, P.F. & COLEPICOLO, P. 2002. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). J. Appl. Phycol. 14: 151-157.
- RYTHER, J.H. & DUSTAN, W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. Science 171: 1008-1013.
- RYTHER, J.H. CORWIN, N., DEBUSK, A.T. & WILLIAMS, L.D. 1981. Nitrogen uptake and storage by the red alga *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan, 1979). Aquaculture 26: 107-115.
- SMIT, A.J. 2002. Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): adaptations to a temporally variable nitrogen environment. Bot. Mar. 45: 196-209.
- SOLOMONSON, L.P. & BARBER, M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 225-253.
- SUZUKI, A. & KNAFF, D.B. 2005. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties and role in the amino acid metabolism. Photosyn. Res. 83: 191-217.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. Fisiologia Vegetal. Artmed Editora. 3ª ed. pp 285-307.
- TEICHEBERG, M., HEFFNER, L.R., FOX, S. & VALIELA, I. 2007. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity, internal N pools and growth of *Ulva lactuca*: responses to long and short-term supply. Mar. Biol. 151: 1249-1259.
- THOMAS, W.H. & HARRISON, P.J. 1988. A comparison of *in vitro* and *in vivo* nitrate reductase assays in three intertidal seaweeds. Bot. Mar. 31: 101-107.
- TISCHNER, R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. Plant Cell Environ. 23: 1005-1024.
- TOPINKA, J.A. 1978. Nitrogen uptake by *Fucus spiralis* (Phaeophyceae). J. Phycol. 14: 241-247.

- TRÉGUER, P. & LE CORRE, P. 1975. Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer (utilisation de l'autoanalyseur II Technicon). Université de Bretagne Occidentale. 2^a ed. 110 p.
- TURPIN, D.H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27: 14-20.
- TURPIN, D.H., ELRIFI, I.R., BIRCH, D.G., WEGER, H.G. & HOLMES, J.J. 1988. Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation in microalgae. *Can. J. Bot.* 66: 2083-2097.
- TYLER, A.C., MCGLATHERY, K.J. & ANDERSON, I.C. 2001. Macroalgae mediation of dissolved nitrogen fluxes in a temperate coastal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 53(2): 155-168.
- TYLER, A.C., MCGLATHERY, K.J. & ANDERSON, I.C. 2003. Benthic algae control fluxes of dissolved organic and inorganic nitrogen compounds in a temperate coastal lagoon. *Limnol. Oceanogr.* 48: 2125-2137.
- TYRRELL, T. 1999. The relative influence of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400: 525-531.
- URSI, S. 2005. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, fotossíntese, pigmentos, polissacarídeos e genes da ficoeritrina de linhagens selvagens e variantes. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 121 p.
- USOV, A.I. 1992. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. *Food Hydrocol.* 6: 9-23.
- VALIENTE, O., FERNÁNDEZ, L.E., PEREZ, R.M., MARQUINA, G. & VELEZ, H. 1992. Agar polysaccharides from the red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kützinger and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. *Bot. Mar.* 35: 77-81.
- VERGARA, J.J. & NIELL, F.X. 1993. Effects of nitrate availability and irradiance on internal nitrogen constituents in *Corallina elongata* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 5: 405-415.
- VERGARA, J.J., BIRD, K.T. & NIELL, F.X. 1995. Nitrogen assimilation following NH₄⁺ pulses in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: effect on C metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 253-263.
- XU, Y., FANG, J. & WEI, W. 2008. Application of *Gracilaria lichenoides* (Rhodophyta) for alleviating excess nutrients in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 20: 199-203.
- YOKOYA, N.S. 2000. Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 48: 133-142.

- YOSHIMURA, C.Y. 2006. Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 162 p.
- YOUNG, E.B., DRING, M.J., SAVIDGE, G., BIRKETT, D.A. & BERGES, J.A. 2007. Seasonal variations in nitrate reductase activity and internal N pools in intertidal brown algae are correlated with ambient nitrate concentrations. *Plant Cell Environ.* 30: 765-774.
- YOUNG, E.B., BERGES, J.A. & DRING, M.J. 2009. Physiological responses of intertidal marine brown algae to nitrogen deprivation and resupply of nitrate and ammonium. *Physiol. Plant.* 135: 400-411.
- YU, S., BLENNOW, A., BOJKO, M., MADSEN, F., OLSEN, C.E. & ENGELSEN, S.B. 2002. Physico-chemical characterization of floridean starch of red algae. *Starch* 54: 66-74.
- ZAR, J.H. 1999. *BIostatistical Analysis*. 4th. Edition. Prince Hall, NJ. 663 p.
- ZECCHINEL, F.E., BRITO, L.L. & LA REZ, E.G. 2000. Propriedades físicas del agar de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariaceae) en Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 48(1): 193-197.
- ZHANG, Q., LI, N., LIU, X., ZHAO, Z., LI, Z., XU, Z. 2004. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its *in vivo* antioxidant activity. *Carbohydr. Res.* 339: 105-111.

Apêndice I

Apêndice I: Otimização do ensaio *in vitro* da nitrato redutase em *Gracilariopsis tenuifrons*.

A nitrato redutase (NR), por ser a primeira enzima na via de redução do nitrato, controla a taxa de assimilação deste nutriente (De la Rosa *et al.*, 1989; Solomonson & Barber, 1990; Berges, 1997; Lartigue & Sherman, 2005). Por esta razão, alguns autores consideram que a atividade da NR poderia ser utilizada para caracterizar o estado nutricional de macroalgas (Davison & Stewart, 1984; Thomas & Harrison, 1988).

A quantificação da atividade *in vitro* da NR por espectrofotometria é um procedimento simples e rápido (Berges & Harrison, 1995). Entretanto, alguns fatores devem ser considerados para melhor acurácia do método: i) padronização das amostras (ex: comprimento dos ápices e presença de ramificações nos mesmos) e ii) otimização da extração e do ensaio enzimático (homogeneização da amostra, preservação e estabilidade da atividade da enzima) (Lobban & Harrison, 1994; Berges & Harrison, 1995; Hurd *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 1997; Granbom *et al.*, 2004; Chow *et al.*, 2004, 2007).

A concentração de NADH e a temperatura de incubação ótimas para o ensaio enzimático da NR, além do comprimento dos ápices, variam para cada espécie de Gracilariaceae estudada (Tabela I), evidenciando a necessidade de padronização desses fatores para trabalhar-se com as respostas máximas da atividade da enzima.

Tabela I. Concentração de NADH e temperatura de incubação ótimas e comprimento dos ápices usados no ensaio enzimático *in vitro* da NR de espécies de Gracilariaceae.

Espécie	NADH (mM)	Temperatura (°C)	Comprimento do ápice (cm)	Referência
<i>Gracilaria birdiae</i>	0,04	20	1,5	Donato (2005)
<i>Gracilaria caudata</i>	0,02	20	1,5	Chow <i>et al.</i> (2007)
<i>Gracilaria chilensis</i>	0,04	20	1,5	Chow & Oliveira (2008)
<i>Gracilaria domingensis</i>	0,04	25	1,5-2	Ferreira (2008)
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	0,4	20	3	Lopes <i>et al.</i> (1997)
<i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	0,1-0,2	20	2,5	Rossa (1999)

A atividade da NR de *Gracilariopsis tenuifrons* já havia sido estudada por Rossa (1999), que caracterizou as propriedades bioquímicas e otimizou um método para extração celular e ensaio *in vitro* da enzima para essa espécie. Segundo o método descrito pelo autor, as amostras (ápices de 2,5 cm) deveriam ser trituradas em nitrogênio líquido e suspensas em tampão de extração contendo 0,2 M tampão fosfato, pH 8 (2,8% *p/v*

NaH₂PO₄.H₂O e 97,2% *p/v* Na₂HPO₄.7 H₂O), 5 mM EDTA, 1 mM DTT e 0,3% *p/v* BSA. Após centrifugação, o sobrenadante seria incubado a 20 °C em um tampão de reação contendo o mesmo tampão fosfato, 6 mM KNO₃ e 0,5 mM MgSO₄. Porém, o autor observou que a concentração ótima de NADH para iniciar a reação enzimática variou de 0,1 a 0,2 mM, de acordo com a fase do histórico de vida e a procedência das algas. Além disso, a maior atividade da enzima foi verificada a 30 °C. Entretanto, sob esta temperatura, as réplicas apresentaram grande variação. De acordo com o autor, a atividade da NR não apresentou diferença significativa entre 20 e 25 °C, sendo que a 25 °C a variação entre as réplicas foi maior. Por isso, o autor considerou 20 °C como a temperatura mais adequada para o ensaio da NR.

O estudo de Rossa (1999) foi desenvolvido com exemplares provenientes de outras localidades e seus cultivos foram mantidos sob condições de nutrientes, temperatura e irradiância diferentes das deste estudo (Tabela II). Uma vez que a atividade da NR depende do estado fisiológico (ex. estoque interno de nitrato) e da fase do histórico de vida das algas (Harrison *et al.*, 1986; Rossa, 1999; Chow, 2002), achou-se interessante otimizar o ensaio da NR para as condições de experimentação empregadas neste estudo (item 3.2 de Material e Métodos).

Tabela II. Fase do histórico de vida, procedência e condições de cultivo de *Gracilariopsis tenuifrons* usadas em Rossa (1999) e no presente trabalho. VS = von Stosch.

	Rossa (1999)	Presente trabalho
Fase e procedência	Gametófito ♀, Venezuela Gametófito ♂, Ubatuba, SP	Gametófito ♀, Cabo Frio, RJ
Solução de enriquecimento	VS 62,5%	VS 50%
Massa fresca/meio de cultivo (g.L ⁻¹)	nc	1
Irradiância (μmol de fótons.m ⁻² .s ⁻¹)	45	65 ± 5
Temperatura (°C)	22	25 ± 1
Fotoperíodo:escuro (h)	12:12	14:10

nc = nada consta

Para tanto, foram analisados os seguintes parâmetros: i) concentração de NADH no tampão de reação (0,005, 0,02, 0,04, 0,08 ou 0,15 mM), ii) temperatura de incubação (20, 25 ou 30 °C) e iii) comprimento dos ápices sem ramificações (2, 2,5 ou 3 cm). Os demais parâmetros e procedimentos do ensaio enzimático seguiram o descrito no item 3.4.4 de Material e Métodos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA)

unifatorial e ao teste *a posteriori* de Newman-Keuls, sob um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica v. 6.0, segundo descrições de Zar (1999).

Primeiramente, foi avaliada a atividade da NR utilizando-se diferentes concentrações de NADH no tampão de reação. Neste caso, os ápices tinham 2,5 cm de comprimento e a temperatura de incubação empregada foi 20 °C e os demais parâmetros seguiram o descrito no item 3.4.4. As maiores atividades da NR, cerca de $42 \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$, foram verificadas utilizando-se NADH nas concentrações 0,02, 0,04 e 0,08 mM (Figura 1a). Resultado semelhante foi observado para a atividade específica da NR (Figura 1b). Foi selecionada a concentração de 0,04 mM para os demais ensaios, uma vez que houve menor variação entre as réplicas e por esta concentração ser usada em trabalhos com outras espécies de Gracilariaceae (Tabela I; Donato, 2005; Chow & Oliveira, 2008; Ferreira, 2008).

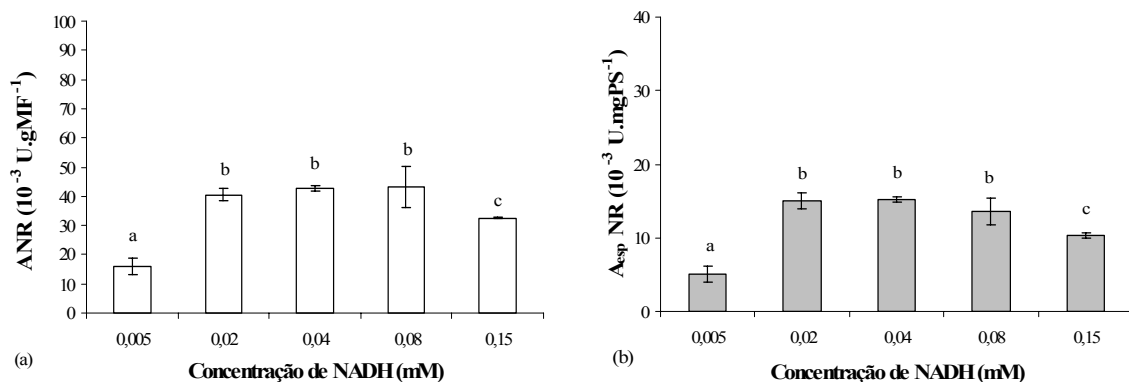


Figura 1. (a) Atividade *in vitro* da NR ($10^{-3} \text{ U.gMF}^{-1}$) e (b) atividade específica da NR ($10^{-3} \text{ U.mgPS}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* frente a diferentes concentrações de NADH no tampão de reação. Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Em seguida, foi avaliada a atividade da NR em diferentes temperaturas de incubação. Aqui, os ápices também tinham 2,5 cm e foi usada a concentração de 0,04 mM de NADH, estabelecida anteriormente como padrão. A atividade da NR foi maior em 25 e 30 °C, cerca de $60 \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$, sendo que não foi observada diferença significativa entre as duas temperaturas ($p = 0,3233$) (Figura 2a). A atividade específica da enzima apresentou um padrão semelhante, porém não houve diferença significativa entre 20 e 30 °C ($p = 0,2062$) e entre 25 e 30 °C ($p = 0,1327$) (Figura 2b). Devido à menor variação entre as réplicas e pelo fato de os cultivos serem mantidos a 25 °C, esta temperatura foi selecionada para os ensaios subseqüentes.

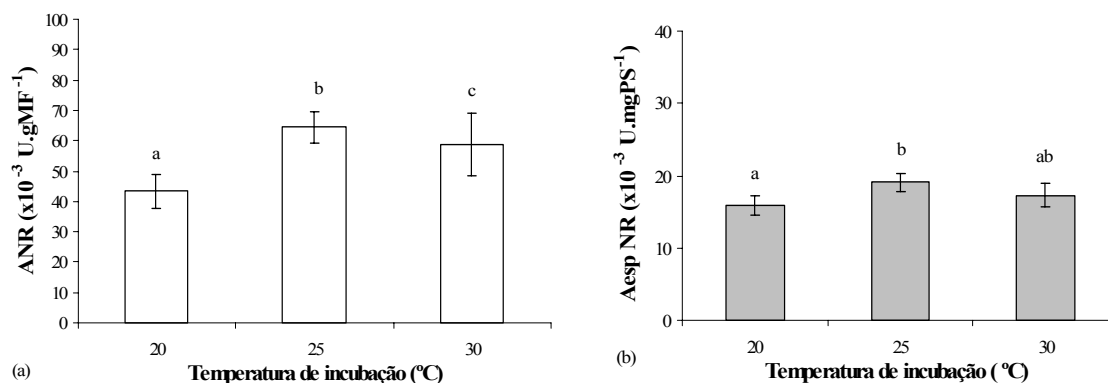


Figura 2. (a) Atividade *in vitro* da NR ($10^{-3} \text{ U.gMF}^{-1}$) e (b) atividade específica da NR ($10^{-3} \text{ U.mgPS}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* frente a diferentes temperaturas de incubação. Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Por último, foi avaliada a atividade da NR em ápices de diferentes comprimentos, utilizando-se 0,04 mM de NADH e 25 °C no ensaio. A maior atividade da enzima, $(79 \pm 13,9) \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$, foi observada em ápices de 2 cm (Figura 3a). O mesmo resultado foi verificado para a atividade específica da NR (Figura 3b). Este resultado provavelmente deveu-se a maior taxa metabólica na porção apical do talo, que apresenta crescimento ativo (Hurd *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 1997; Chow, 2002; Chow *et al.*, 2007), uma vez que o crescimento da espécie deve-se ao meristema apical. Portanto, foi padronizada a utilização de ápices 2 cm para os ensaios seguintes.

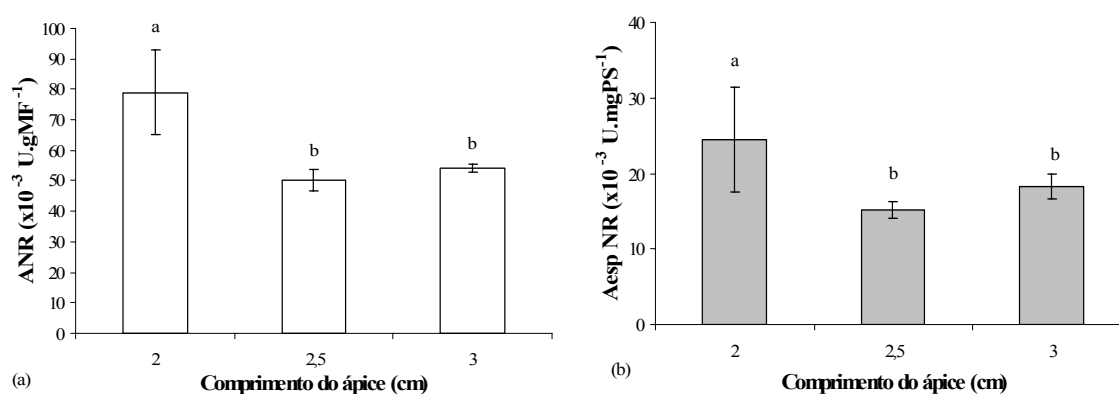


Figura 3. (a) Atividade *in vitro* da NR ($10^{-3} \text{ U.gMF}^{-1}$) e (b) atividade específica da NR ($10^{-3} \text{ U.mgPS}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons* em ápices de diferentes comprimentos. Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A concentração de NADH e a temperatura de incubação ótimas para o ensaio *in vitro* da NR *Gp. tenuifrons* divergiram das observadas por Rossa (1999) (Tabela I), possivelmente devido às diferenças em relação à procedência das algas, à fase do histórico

de vida e às condições de cultivo. A máxima atividade da NR verificada por Rossa (1999) foi aproximadamente $44,1 \cdot 10^{-3} \text{ U.g}^{-1}$, resultado inferior ao verificado no presente trabalho (Tabela III). A atividade de NR de *Gp. tenuifrons* observada neste trabalho foi superior a de *Gracilaria tenuistipitata* (Lopes *et al.*, 1997), semelhante a de *Gracilaria birdiae* (Donato, 2005) e inferior a de *Gracilaria caudata* (Chow *et al.*, 2007) e *Gracilaria chilensis* (Chow *et al.*, 2004) (Tabela III). Além das diferenças nos protocolos utilizados no ensaio enzimáticos, estes resultados podem estar relacionados às condições de nitrato empregadas no cultivo das algas (Tabela III), uma vez que a disponibilidade de nitrato é um dos principais fatores regulares da atividade da NR (Lartigue & Sherman, 2005; Chow *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2007; Chow & Oliveira, 2008).

Tabela III. Máxima atividade *in vitro* da NR e concentração de nitrato empregada no meio de cultivo de diferentes espécies de Gracilariaceae.

Espécie	ANR ($10^{-3} \text{ U.gMF}^{-1}$)	Nitrato no meio de cultivo (μM)	Referência
<i>Gracilaria birdiae</i>	74,5	250	Donato, 2005
<i>Gracilaria caudata</i>	92,9	250	Chow <i>et al.</i> , 2007
<i>Gracilaria chilensis</i>	253,2	500	Chow <i>et al.</i> , 2004
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	43,3	nc	Lopes <i>et al.</i> , 1997
<i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	44,1	62,5	Rossa, 1999
	79,0	250	Presente trabalho

nc = nada consta

Portanto, 0,04 mM NADH e temperatura de incubação de 25 °C foram adotadas para os ensaios enzimáticos seguintes com a finalidade de trabalhar-se com respostas máximas da atividade da NR. Além disso, foi estabelecida a utilização de ápices 2 cm nos demais ensaios e na maior parte dos experimentos, salvo exceções especificadas em Material e Métodos.

Referências Bibliográficas

- BERGES, J.A. 1997. Algal nitrate reductases. *Eur. J. Phycol.* 32: 3-8.
- 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. *Limnol. Oceanogr.* 40(1): 82-93

- CHOW, F.F. 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 136 p.
- CHOW, F., OLIVEIRA, M.C. & PEDERSÉN, M. 2004. *In vitro* assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. J. Plant Physiol. 161: 769-776.
- CHOW, F., CAPOCIAMA, F.V., FARIA, R. & OLIVEIRA, M.C. 2007. Characterization of nitrate reductase activity *in vitro* in *Gracilaria caudata* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales). Rev. Bras. Bot. 30: 123-129.
- CHOW, F. & OLIVEIRA, M.C. 2008. Rapid and slow modulation of nitrate reductase activity in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta): influence of different nitrogen sources. J. Appl. Phycol. 20: 775-782.
- DAVISON, I.R. & STEWART, W.D.P. 1984. Studies on nitrate reductase activity in *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour. II. The role of nitrate availability in the regulation of enzyme activity. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 79: 65-78
- DE LA ROSA, M.A., RONCEL, M. & NAVARRO, J.A. 1989. Flavin-mediated photoregulation of nitrate reductase: a key point of control in inorganic nitrogen photosynthetic metabolism. Bioelectrochem. Bioenerg. 22: 355-364.
- DONATO, R. Diversidade intraespecífica em linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birbiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, caracterização pigmentar, fotossíntese e assimilação de nitrato. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 98 p.
- FERREIRA, L.B. 2008. Diversidade intraespecífica em *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): estudos fisiológicos na interpretação do polimorfismo de cor. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 200 p.
- GRANBOM, M., CHOW, F., LOPES, P.F., OLIVEIRA, M.C., COLEPICCOLO, P., PAULA, E.J. & PEDERSÉN M. 2004. Characterization of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). Aquat. Bot. 78: 295-305.
- HARRISON, P.J., DRUEHL, L.D., LLOYD, K.E. & THOMPSON, P.A. 1986. Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groenlandica* (Laminariales, Phaeophyta). Mar. Bot. 93: 29-35.
- 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 gardneri* (Phaeophyta). J. Phycol. 31: 835-843.

- LARTIGUE, J. & SHERMAN, T.D. 2005. Response of *Enteromorpha* sp. (Chlorophyceae) to a nitrate pulse: nitrate uptake, inorganic nitrogen storage and nitrate reductase activity. Mar. Ecol. Prog. Ser. 292: 147-157.
- LOBBAN, C.S. & HARRISON, P.J. 1994. SEAWEED ECOLOGY AND PHYSIOLOGY. Cambridge University Press. Cambridge. pp 163-209.
- LOPES, P.F., OLIVEIRA, M.C. & COLEPICOLO, P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J. Phycol. 33: 225-231.
- ROSSA, M.M. 1999. A luz como fator de regulação da atividade enzimática da nitrato redutase (NR) e superóxido dismutase (SOD) em *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta). Tese de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 109 p.
- SOLOMONSON, L.P. & BARBER, M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 225-253.
- THOMAS, W.H. & HARRISON, P.J. 1988. A comparison of *in vitro* and *in vivo* nitrate reductase assays in three intertidal seaweeds. Bot. Mar. 31: 101-107.
- YOUNG, E.B., DRING, M.J., SAVIDGE, G., BIRKETT, D.A. & BERGES, J.A. 2007. Seasonal variations in nitrate reductase activity and internal N pools in intertidal brown algae are correlated with ambient nitrate concentrations. Plant Cell Environ. 30: 765-774.
- ZAR, J.H. 1999. BIostatistical ANALYSIS. 4th. Edition. Prince Hall, NJ. 663 p.

Apêndice II

Apêndice II: Padronização da extração e da quantificação de ficobiliproteínas e clorofila *a* em *Gracilariopsis tenuifrons*.

Clorofila *a* e ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) são os principais pigmentos fotossintetizantes encontrados nas algas vermelhas (Kursar *et al.*, 1983). Considera-se que as ficobiliproteínas, especialmente a ficoeritrina, constituem uma das principais reservas intracelulares de nitrogênio nas rodófitas (Bird *et al.*, 1982; Lapointe & Duke, 1984; García-Sánchez *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999). O conteúdo de aloficocianina é estimado em menos de 5% do total de ficobiliproteínas e considerado constante, independentemente dos fatores ambientais (De Marsac *et al.*, 1988). Vários estudos indicam que a clorofila *a* seria uma reserva secundária de nitrogênio nas algas vermelhas (García-Sánchez *et al.*, 1993; Vergara *et al.*, 1995; Andria *et al.*, 1999; Costa, 2005; Martins, 2007).

Os pigmentos são comumente identificados pelos seus espectros de absorção de luz, por isso muitos métodos para determinação da concentração de pigmentos em extratos aquosos ou em solventes orgânicos baseiam-se em medidas espectrofotométricas (Geider & Osborne, 1992).

Em nosso laboratório, a extração de ficobiliproteínas e clorofila *a* comumente segue o método descrito por Kursar *et al.* (1983). De acordo com o método, a extração de ficobiliproteínas deve ser feita no escuro por meio de maceração das amostras de 300 mg de massa fresca em 4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,5 (81,8% *p/v* NaH₂PO₄.H₂O e 18,2% *p/v* Na₂HPO₄.7 H₂O). Após centrifugação a 20550 rpm e 4 °C por 20 min, o sobrenadante é analisado espectrofotometricamente e a concentração de cada ficobiliproteína é dada pelas fórmulas a seguir, também descritas por Kursar *et al.* (1983):

$$FE = 155,8 \cdot A_{498,5} - 40 \cdot A_{614} - 10,5 \cdot A_{651} \quad (1)$$

$$FC = 151,1 \cdot A_{614} - 99,1 \cdot A_{651} \quad (2)$$

$$AFC = 181,3 \cdot A_{651} - 22,3 \cdot A_{614} \quad (3)$$

Onde FE = concentração de ficoeritrina, FC = concentração de ficocianina, AFC = concentração de aloficocianina e A_x = absorvância no comprimento de onda x. Os resultados são expressos em µg.mL⁻¹, mas podem ser padronizados pela massa fresca da alga, fornecendo resultados em µg.g⁻¹.

O material sedimentado na centrifugação do extrato das ficobiliproteínas é ressuspenso em 3 mL de acetona 90% e homogeneizado por 15 min, no escuro. A seguir, o material é centrifugado a 10730 rpm e 4 °C por 15 min e o sobrenadante recuperado para a análise do conteúdo de clorofila *a* por espectrofotometria. A concentração desse

pigmento fotossintetizante é calcula a partir da fórmula descrita por Jeffrey & Humphrey (1975) (4), porém assumindo-se absorbância igual a zero em A_{647} , uma vez que rodófitas não possuem clorofila *b* (Oliveira, 2003) (5):

$$Cl\ a = 11,93 \cdot A_{664} - 1,93 \cdot A_{647} \quad (4)$$

$$Cl\ a = 11,93 \cdot A_{664} \quad (5)$$

Onde $Cl\ a$ = concentração de clorofila *a* e A_x = absorbância no comprimento de onda *x*. Os resultados são expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas também podem ser padronizados pela massa fresca da alga, fornecendo resultados em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

A recomendação para extraírem-se os pigmentos no escuro deve-se à sensibilidade dos mesmos à fotodegradação. Porém, a extração de ficobiliproteínas no escuro pode trazer prejuízo à sua quantificação, uma vez que é freqüente a perda de material durante a maceração das algas (observação pessoal), devido à falta de luminosidade para visualização do material. Conseqüentemente, também afetaria a determinação do conteúdo de clorofila *a*. O uso de nitrogênio líquido permite a melhor trituração dos materiais e preserva os compostos a serem estudados (ex. atividade enzimática, proteínas, entre outros) (Küppers & Weidner, 1980; Lopes *et al.*, 1997; Chow, 2002). Assim, para contornar o problema de perda de amostra e evitar a degradação dos pigmentos, a trituração das algas poderia ser feita em penumbra, com uso de nitrogênio líquido, e posterior ressuspensão do triturado no tampão de extração gelado e protegido contra luminosidade.

O pH do tampão fosfato também pode influenciar a extração das ficobiliproteínas (Kursar *et al.*, 1983), sendo que na literatura são encontrados valores de pH variando de 5,5 a 7 (Kursar & Alberte, 1983; Kursar *et al.*, 1983; Beer & Eshel, 1985; Figueroa *et al.*, 1995, 1997; Sampath-Wiley & Neefus, 2007), apesar do pH do cloroplasto ser 8,0 (Raven *et al.*, 2001), que poderia ser o pH ideal para a extração das ficobiliproteínas. Porém, nenhum desses trabalhos aborda qual seria o melhor pH para a extração deste pigmento fotossintetizante.

Além disso, novas fórmulas têm sido desenvolvidas para a quantificação de ficobiliproteínas, sendo as descritas por Beer & Eshel (1985) mais comumente usadas. Estas fórmulas não são sensíveis a componentes não ficobiliprotéicos (substâncias particuladas em suspensão) presentes no extrato, como são as descritas por Kursar *et al.* (1983). Porém, Beer & Eshel (1985) descreveram fórmulas apenas para ficoeritrina e ficocianina, visto que a quantificação de aloficocianina por espectrofotometria é dificultada pela presença de pequenas quantidades de clorofila *a* no extrato, a qual interfere na absorção da luz. As fórmulas descritas por Beer & Eshel (1985) são:

$$FE = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \cdot 0,20] \cdot 0,12 \quad (6)$$

$$FC = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) \cdot 0,51] \cdot 0,15 \quad (7)$$

Onde FE = concentração de ficoeritrina, FC = concentração de ficocianina e A_x = absorvância no comprimento de onda x. Da mesma forma, os resultados são expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, podendo ser padronizados pela massa fresca da alga, fornecendo resultados em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

A acetona, diluída a 90%, é um dos solventes orgânicos mais usados para a extração de clorofilas (Jeffrey & Humphrey, 1975; Figueroa *et al.*, 1995, 1997; Yokoya *et al.*, 2007). Recentemente, outros solventes orgânicos têm sido empregados para a extração de clorofilas e novas fórmulas têm sido desenvolvidas para a sua quantificação, uma vez que o coeficiente de extinção das clorofilas varia de acordo com o tipo de solvente e sua diluição. Entre esses solventes estão: i) acetona 80% (Inskeep & Bloom, 1985; Wellburn, 1994), ii) acetona 80% tamponada (Na_2HPO_4 2,5 mM, pH 7,8) (Porra *et al.*, 1989; Porra, 2002), iii) N,N-dimetilformamida (DMF; Inskeep & Bloom, 1985; Porra *et al.*, 1989; Wellburn, 1994; Porra, 2002), iv) dimetilsulfóxido (DMSO; Wellburn, 1994) e v) metanol (Porra *et al.*, 1989; Wellburn, 1994; Porra, 2002). Com a utilização de DMF e DMSO, por exemplo, não seria necessária a trituração das amostras, sendo que os materiais ficariam incubados por algumas horas no solvente (Hagerthey *et al.*, 2006). Apesar de diversos trabalhos empregarem 24 h para a extração das clorofilas (Korbee *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2006, Xu & Gao, 2008), este longo tempo não é aconselhável, visto que pode ocorrer a degradação oxidativa do pigmento (Porra, 2002; Hagerthey *et al.*, 2006;). As fórmulas para quantificação de clorofila *a*, para organismos que possuem clorofila *a* e *b*, de acordo com o solvente orgânico, são exibidas na Tabela IV. Os resultados obtidos por essas fórmulas, em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, podem ser padronizados pela massa fresca da alga e, assim, serem expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Tabela IV. Fórmulas para quantificação de clorofila *a*, derivadas para organismos que possuem clorofila *a* e *b*, de acordo com o solvente orgânico: acetona 90%, acetona 80%, acetona 80% tamponada, DMF, DMSO ou metanol, onde Cl *a* = clorofila *a* e A_x = absorvância no comprimento de onda *x*.

Solventes	Fórmulas	Autores
Acetona 90%	$Cl\ a = 11,93 \cdot A_{664} - 1,93 \cdot A_{647}$ (4)	Jeffrey & Humphrey, 1975
Acetona 80%	$Cl\ a = 12,63 \cdot A_{664,5} - 2,52 \cdot A_{647}$ (8)	Inskeep & Bloom, 1985
	$Cl\ a = 12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646}$ (9)	Wellburn, 1994
Acetona 80% tamponada	$Cl\ a = 12,25 \cdot A_{664} - 2,55 \cdot A_{647}$ (10)	Porra <i>et al.</i> , 1989; Porra, 2002
DMF	$Cl\ a = 12,70 \cdot A_{664,5} - 2,79 \cdot A_{647}$ (11)	Inskeep & Bloom, 1985
	$Cl\ a = 12,00 \cdot A_{664} - 3,11 \cdot A_{647}$ (12)	Porra <i>et al.</i> , 1989; Porra, 2002
	$Cl\ a = 11,65 \cdot A_{664} - 2,69 \cdot A_{647}$ (13)	Wellburn, 1994
DMSO	$Cl\ a = 12,19 \cdot A_{665} - 3,45 \cdot A_{649}$ (14)	Wellburn, 1994
Metanol	$Cl\ a = 16,29 \cdot A_{665} - 8,54 \cdot A_{652}$ (15)	Porra <i>et al.</i> , 1989; Porra, 2002
	$Cl\ a = 15,65 \cdot A_{666} - 7,34 \cdot A_{653}$ (16)	Wellburn, 1994

As fórmulas mostradas na Tabela IV consideram a clorofila *b* como parte da composição de clorofilas do organismo, sendo que a presença de clorofila *b* também está embutida na fórmula para a quantificação da clorofila *a*. Portanto, estas fórmulas não seriam adequadas para rodófitas, uma vez que foi demonstrado que algas vermelhas apresentam apenas clorofila *a* (Oliveira, 2003). Uma prática freqüentemente adotada é apenas considerar a absorvância da clorofila *b* igual a zero, como na fórmula 5. Isto, porém, não seria correto, uma vez que o coeficiente de extinção do comprimento de onda da clorofila *a* também é influenciado pela clorofila *b*. Para a utilização dessas fórmulas em rodófitas seria necessário, então, derivar a fórmula inicial considerando apenas a clorofila *a*.

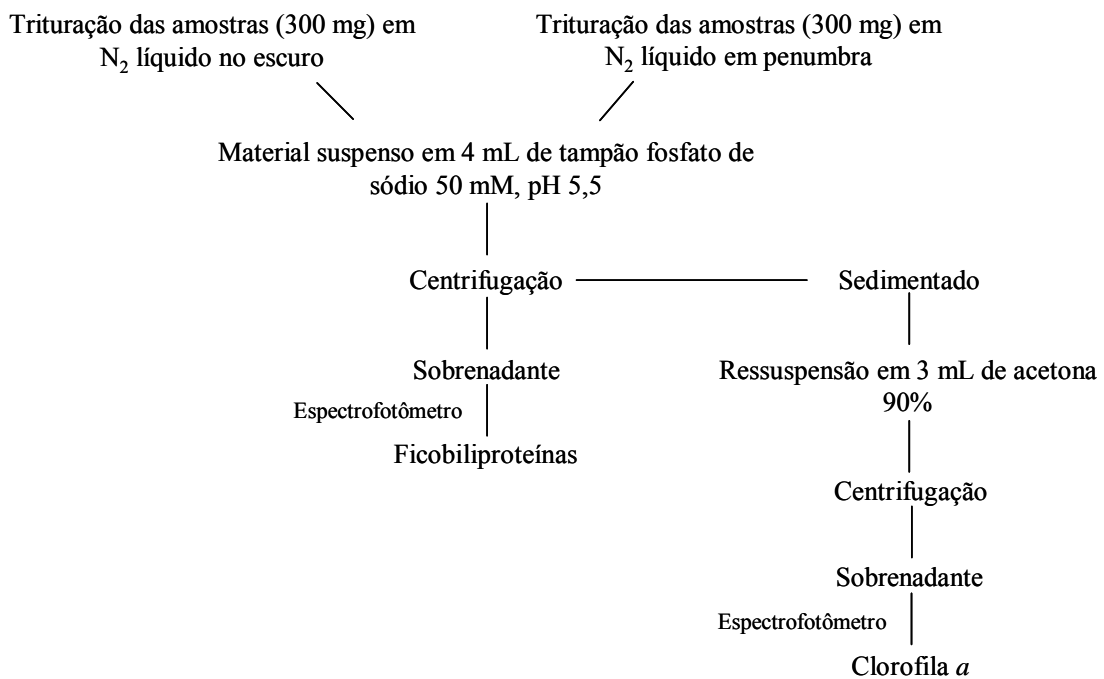
Freqüentemente, a absorvância medida, tanto na quantificação de ficobiliproteínas quanto na de clorofila *a*, ultrapassa o valor de 1 (observação pessoal) sendo necessário diluir a amostra, com tampão fosfato ou solvente orgânico, para uma leitura acurada (Lichtenthaler & Buschmann, 2001). Portanto, outro ponto interessante para a padronização do protocolo seria avaliar a redução de massa fresca usada na extração. Dessa forma, o cultivo das algas para obtenção da massa fresca necessária à extração também seria otimizado.

Devido à variedade de métodos de extração existentes, decidiu-se padronizar o protocolo de extração de ficobiliproteínas e clorofila *a* para *Gp. tenuifrons*, o qual poderia ser aplicado para outras Gracilariaceae.

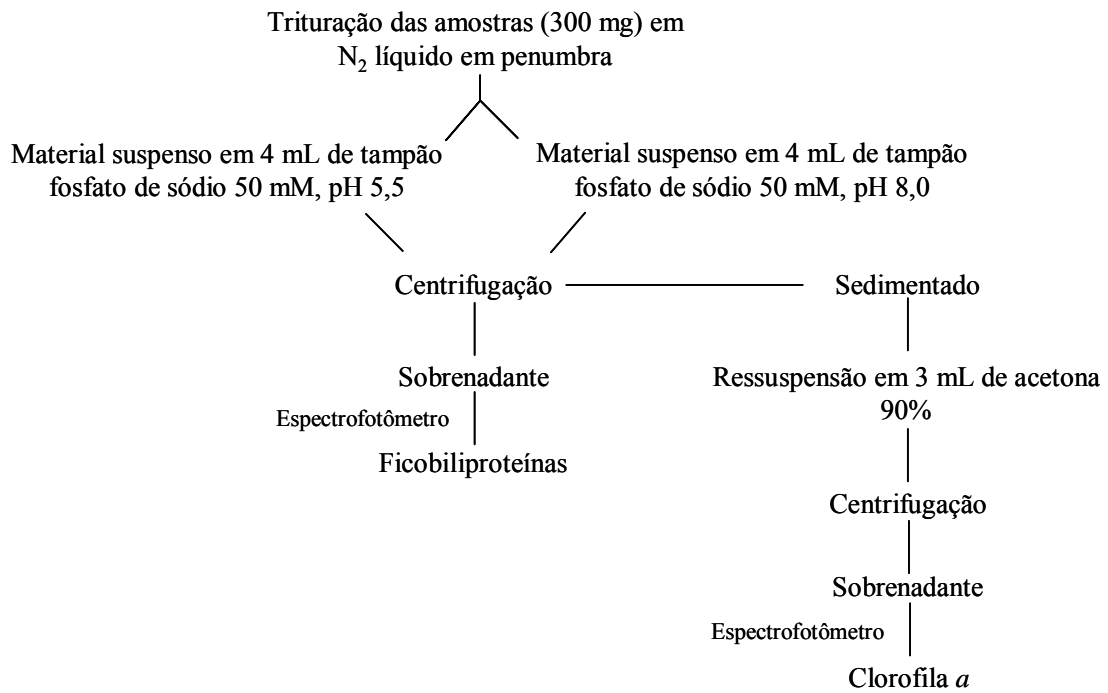
Para tanto, amostras de *Gp. tenuifrons* foram cultivadas seguindo as descrições do item 3.2 de Material e Métodos. O método descrito por Kursar *et al.* (1983) foi utilizado como base para o estabelecimento do novo protocolo de extração de ficobiliproteínas e clorofila *a*.

Os seguintes parâmetros foram analisados: i) ambiente de extração (escuro ou penumbra, ii) pH do tampão fosfato de sódio (5,5 ou 8,0), iii) massa fresca usada nas extrações (300 mg ou 120 mg), iv) solventes para extração de clorofila *a* (acetona 90%, acetona 80%, acetona 80% tamponada, DMF, DMSO ou metanol) e v) trituração, incubação por 3 h ou trituração + incubação por 3 h das amostras para extração da clorofila *a*. Abaixo estão esquematizados cada um dos testes realizados.

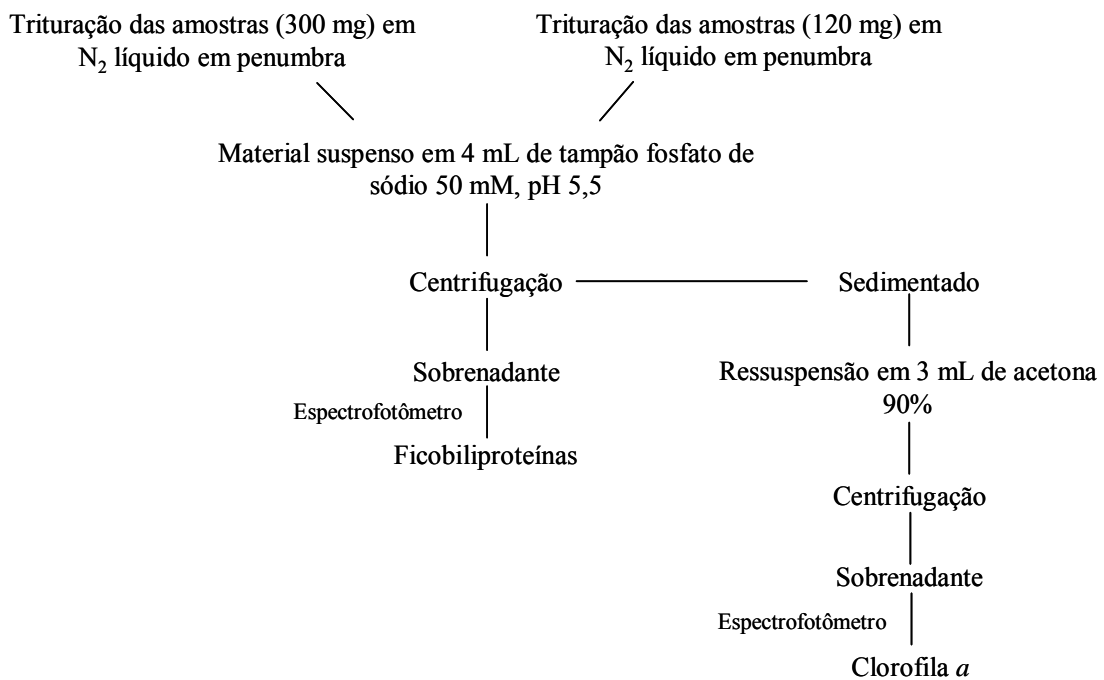
I) Ambiente de extração (escuro ou penumbra)



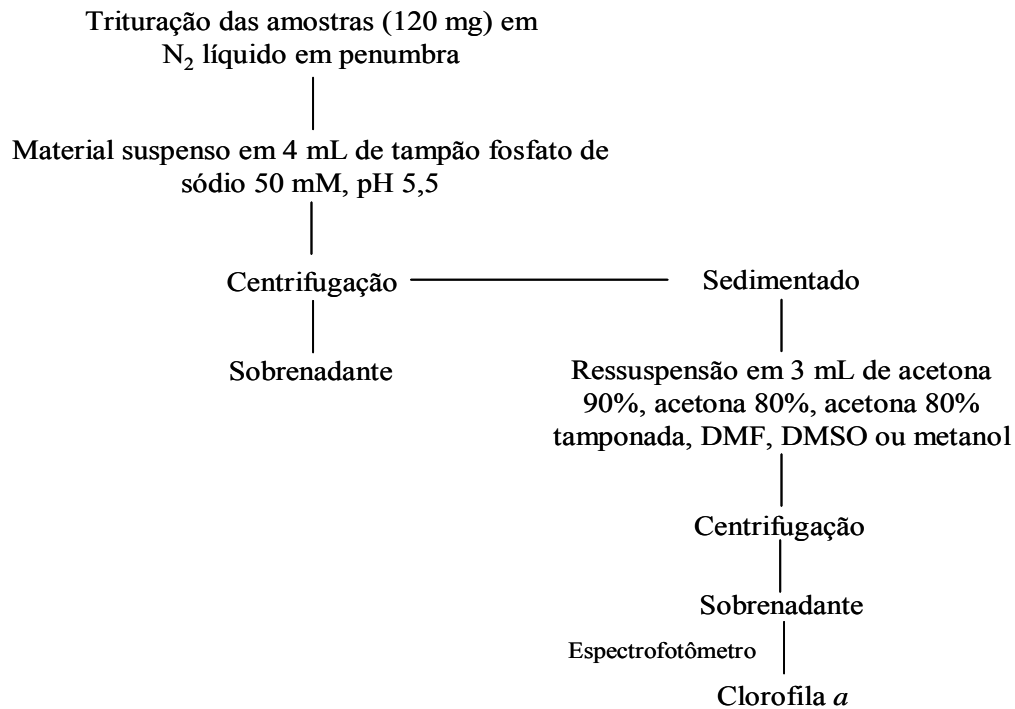
II) pH do tampão fosfato de sódio (5,5 ou 8,0)



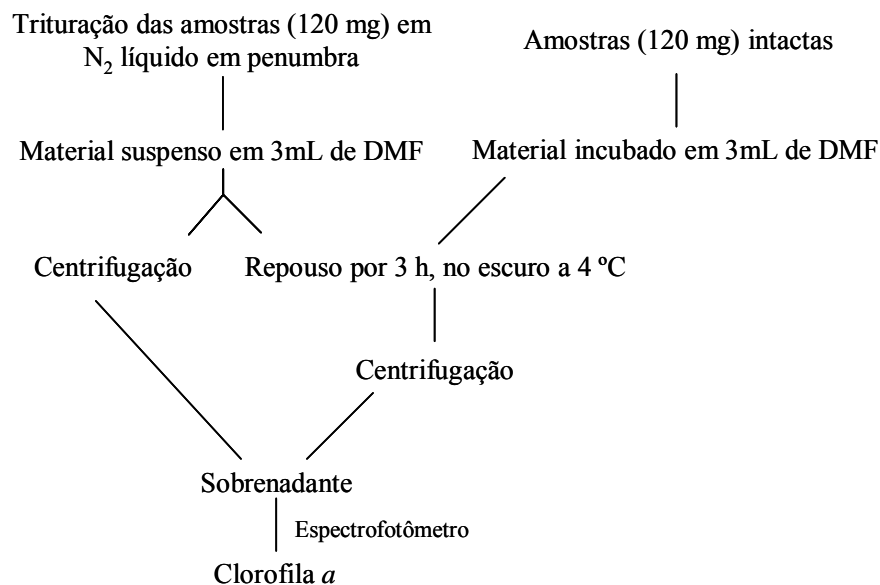
III) Massa fresca usada nas extrações (300 mg ou 120 mg)



IV) Solventes para extração de clorofila *a* (acetona 90%, acetona 80%, acetona 80% tamponada, DMF, DMSO ou metanol)



V) Trituração, incubação por 3 h ou trituração + incubação por 3 h das amostras para extração da clorofila *a*.



As centrifugações dos materiais suspensos em tampão fosfato de sódio para extração das ficobiliproteínas foram realizadas a 20550 rpm e 4 °C por 20 min (Sorvall, RC 5C plus). As centrifugações dos materiais suspensos em solvente orgânico foram feitas a 10730 rpm e 4 °C por 15 min (Sorvall, RC 5C plus). Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro com resolução de 2 nm (Shimadzu, UV 1650PC), utilizando-se cubeta de quartzo de percurso óptico de 1 cm.

Além disso, foram avaliadas as fórmulas de Kursar *et al.* (1983) e Beer & Eshel (1985) para determinação da concentração de ficobiliproteínas, assim como as fórmulas modificadas de Jeffrey & Humphrey (1975), Inskeep & Bloom (1985), Porra *et al.*, 1989/Porra (2002) e Wellburn (1994) para clorofila *a*, extraída com uso de diferentes solventes (Tabela V).

Como exemplo, abaixo estão detalhados os passos para a obtenção da fórmula modificada a partir da original de Jeffrey & Humphrey (1975):

$$A_{664} = \alpha \cdot Cl\ a + \alpha \cdot Cl\ b \quad (17)$$

Onde A_{664} = absorvância em 664 nm, α = coeficiente de extinção específico ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$), $Cl\ a$ = clorofila *a* e $Cl\ b$ = clorofila *b*.

Uma vez que em rodófitas não há clorofila *b* (Oliveira, 2003) e que o coeficiente de extinção da clorofila *a* em acetona 90%, em 664 nm, é 87,67 (Jeffrey & Humphrey, 1975), a fórmula para determinação da clorofila *a* ficaria:

$$Cl\ a = A_{664}/87,67 \quad (18)$$

Esta fórmula forneceria resultado em $g \cdot L^{-1}$, porém, o usualmente empregado é $\mu g \cdot mL^{-1}$. Portanto, a fórmula 18 deve ser multiplicada por 10^3 , resultando na seguinte equação:

$$Cl\ a = 11,41 \cdot A_{664} \quad (19)$$

Tabela V. Fórmulas modificadas para quantificação de clorofila *a* extraída em acetona 90%, acetona 80%, acetona 80% tamponada, DMF, DMSO ou metanol, em rodófitas, onde α = coeficiente de extinção específico ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$), $Cl\ a$ = clorofila *a* e A_x = absorvância no comprimento de onda x .

Solventes	α	Fórmulas modificadas	Autores da fórmula original
Acetona 90%	87,67	$Cl\ a = 11,41 \cdot A_{664}$ (19)	Jeffrey & Humphrey, 1975
Acetona 80%	82,37	$Cl\ a = 12,14 \cdot A_{664,5}$ (20)	Inskeep & Bloom, 1985
	86,95	$Cl\ a = 11,50 \cdot A_{663}$ (21)	Wellburn, 1994
Acetona 80% tamponada	85,95	$Cl\ a = 11,63 \cdot A_{664}$ (22)	Porra <i>et al.</i> , 1989; Porra, 2002
DMF	82,80	$Cl\ a = 12,08 \cdot A_{664,5}$ (23)	Inskeep & Bloom, 1985
	88,74	$Cl\ a = 11,27 \cdot A_{664}$ (24)	Porra <i>et al.</i> , 1989; Porra, 2002
	90,41	$Cl\ a = 11,06 \cdot A_{664}$ (25)	Wellburn, 1994
DMSO	80,08	$Cl\ a = 11,35 \cdot A_{665}$ (26)	Wellburn, 1994
	79,95	$Cl\ a = 12,51 \cdot A_{665}$ (27)	Porra <i>et al.</i> , 1989; Porra, 2002
Metanol	79,24	$Cl\ a = 12,62 \cdot A_{666}$ (28)	Wellburn, 1994

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial e ao teste *a posteriori* de Newman-Keuls, sob um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica v. 6.0, segundo descrições de Zar (1999).

Primeiramente, foi avaliada a concentração dos pigmentos fotossintetizantes após extração no escuro ou em penumbra. A concentração das ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) foi maior quando o material foi extraído em penumbra, independentemente da fórmula usada no cálculo (Figura 4). A menor concentração observada quando as ficobiliproteínas foram extraídas no escuro provavelmente deveu-se à perda de material, uma vez que, após o procedimento, foi constatada a presença de pequenos fragmentos do talo das algas aderidos ao papel alumínio (no qual as algas são mantidas congeladas), os quais não puderam ser visualizados no escuro.

Para cada tratamento (escuro ou penumbra), não houve diferenças entre as concentrações de ficoeritrina com o uso das fórmulas de Kursar *et al.* (1983) ou Beer & Eshel (1985) ($p > 0,2122$) (Figura 4). Entretanto, o conteúdo de ficocianina foi maior quando a fórmula de Kursar *et al.* (1983) foi empregada ($p = 0,0002$) (Figura 4).

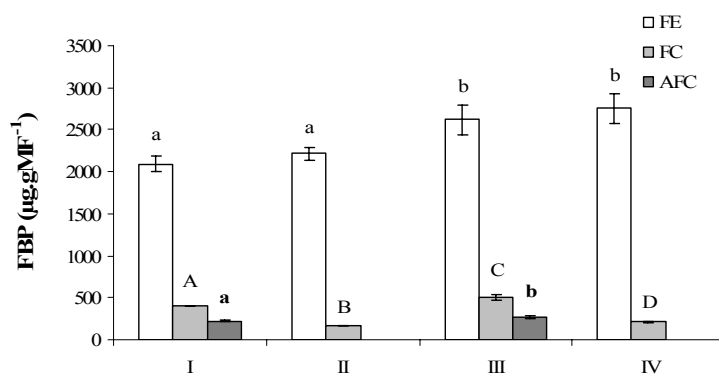


Figura 4. Concentração de ficobiliproteínas ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. FE = ficoeritrina, FC = ficocianina e AFC = aloficocianina. I = extração no escuro e fórmula de Kursar *et al.* (1983), II = extração no escuro e fórmula de Beer & Eshel (1985), III = extração em penumbra e fórmula de Kursar *et al.* (1983) e IV = extração em penumbra e fórmula de Beer & Eshel (1985). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Após a extração das ficobiliproteínas, foi efetuada a extração da clorofila *a* no escuro ou em penumbra, com o uso de acetona 90%. Para o cálculo da concentração desse pigmento foi usada a fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975) (Tabela V). Não foi observada diferença significativa entre o conteúdo de clorofila *a* extraída no escuro ou em penumbra ($p = 0,8099$) (Figura 5).

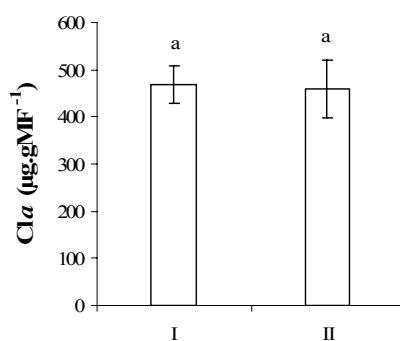


Figura 5. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. I = extração no escuro e II = extração em penumbra, fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Como o conteúdo de ficobiliproteínas foi maior efetuando-se as extrações em penumbra, esta condição foi escolhida para a realização das demais extrações.

Em seguida, realizando-se as extrações em penumbra, foi analisado o pH do tampão fosfato usado na extração das ficobiliproteínas. A menor concentração de ficoeritrina foi

observada quando foi utilizado tampão fosfato de pH 8,0 e a fórmula de Kursar *et al.* (1983), porém o valor foi semelhante aos encontrados quando empregado tampão fosfato de pH 8,0 e fórmula de Beer & Eshel (1985) ou tampão fosfato pH 5,5 e fórmula de Kursar *et al.* (1983) ($p > 0,0720$) (Figura 6). Além disso, estes dois últimos foram semelhantes à concentração encontrada com o uso de tampão fosfato pH 5,5 e fórmula de Beer & Eshel (1985).

A concentração de ficocianina foi maior quando o material foi extraído em tampão pH 5,5, independentemente da fórmula usada no cálculo (Figura 6). Porém, o conteúdo de aloficocianina foi maior usando-se tampão fosfato pH 8,0 ($p = 0,0095$) (Figura 6).

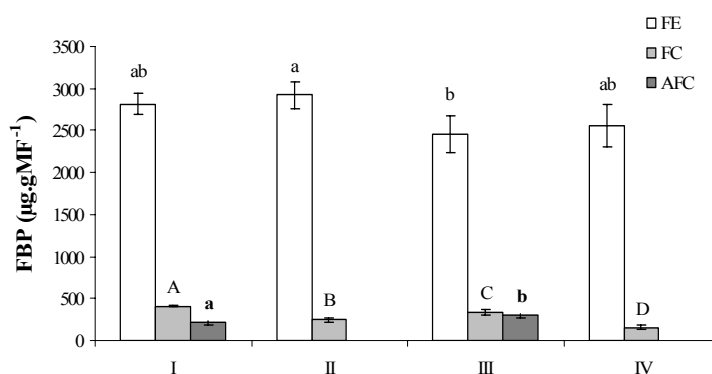


Figura 6. Concentração de ficobiliproteínas ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. FE = ficoeritrina, FC = ficocianina e AFC = aloficocianina. I = extração em tampão fosfato pH 5,5 e fórmula de Kursar *et al.* (1983), II = extração em tampão fosfato pH 5,5 e fórmula de Beer & Eshel (1985), III = extração em tampão fosfato pH 8,0 e fórmula de Kursar *et al.* (1983) e IV = extração em tampão fosfato pH 8,0 e fórmula de Beer & Eshel (1985). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A concentração de clorofila *a* também foi determinada após a extração das ficobiliproteínas em tampão fosfato de pH 5,5 ou 8,0. Para tanto, foi usada acetona 90% como solvente e a fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975) (Tabela V). Não houve diferença significativa entre os dois tratamentos ($p = 0,3771$), porém houve uma grande variação na concentração de clorofila *a* após a extração das ficobiliproteínas em tampão de pH 8,0 (Figura 7), que poderia ser decorrente da alomerização da molécula de clorofila *a* em condições mais alcalinas (Porra *et al.*, 1989).

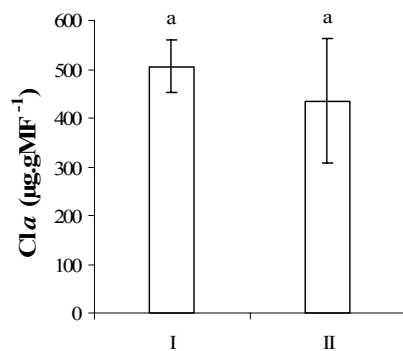


Figura 7. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilaria tenuifrons*. I = extração de ficobiliproteínas em tampão fosfato pH 5,5 e II = extração de ficobiliproteínas em tampão fosfato pH 8,0, fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Devido à diferença observada na concentração de ficocianina e a maior variação no conteúdo de clorofila *a* quando usado tampão fosfato de pH 8,0 para extrair as ficobiliproteínas, o tampão fosfato de pH 5,5 foi selecionado para ser empregado nas extrações seguintes.

Nesses dois primeiros testes, realizados com amostras de 300 mg de massa fresca de alga, foi necessário diluir os extratos de ficobiliproteínas e de clorofila *a*, uma vez que a absorbância encontrada foi superior a 1. A diluição que se mostrou mais adequada para a determinação do conteúdo de ficobiliproteínas foi de 400 μL de extrato em 600 μL de tampão fosfato de sódio, gerando um volume final de 1 mL. Para a determinação da concentração de clorofila *a*, 150 μL de extrato foram diluídos em 850 μL de solvente orgânico. Como o volume de extrato de ficobiliproteínas foi maior, ele foi usado como parâmetro para definir uma menor quantidade de massa fresca de algas a ser usada nas próximas extrações. Por simples regra de três, o valor encontrado foi de 120 mg de massa fresca. Portanto, ainda haveria necessidade de diluição do extrato contendo a clorofila *a*.

Então, foi avaliada a concentração dos pigmentos fotossintetizantes com a redução da massa fresca de alga, de 300 mg para 120 mg, efetuando-se as extrações em penumbra e usando tampão fosfato de pH 5,5 para as ficobiliproteínas. A concentração de ficoeritrina foi semelhante entre os tratamentos, independentemente da fórmula empregada no cálculo ($p = 0,5181$) (Figura 8). O conteúdo de ficocianina também foi semelhante entre os tratamentos, porém maior com o uso da fórmula de Kursar *et al.* (1983) (Figura 8). A única

diferença observada entre os tratamentos foi em relação à concentração de aloficocianina, maior utilizando-se 300 mg de massa fresca de alga ($p = 0,0098$) (Figura 8).

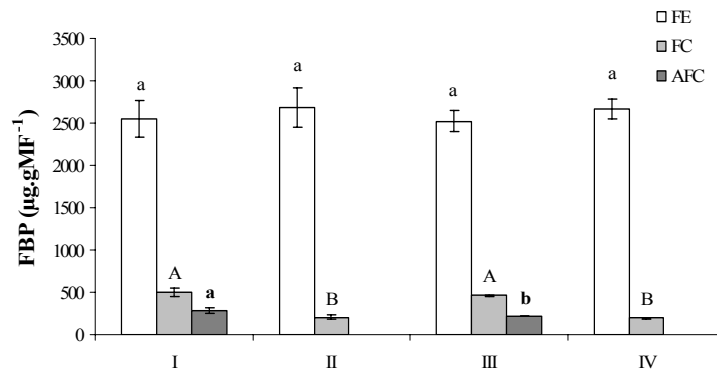


Figura 8. Concentração de ficobiliproteínas ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. FE = ficoeritrina, FC = ficocianina e AFC = aloficocianina. I = extração a partir de 300 mg de massa fresca e fórmula de Kursar *et al.* (1983), II = extração a partir de 300 mg de massa fresca e fórmula de Beer & Eshel (1985), III = extração a partir de 120 mg de massa fresca e fórmula de Kursar *et al.* (1983) e IV = extração a partir de 120 mg de massa fresca e fórmula de Beer & Eshel (1985). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

O conteúdo de clorofila *a* também foi determinado, utilizando-se acetona 90% e a fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975) (Tabela V). Não foi observada diferença no conteúdo de clorofila *a* a partir de 300 mg ou 120 mg de massa fresca de alga ($p = 0,7292$) (Figura 9).

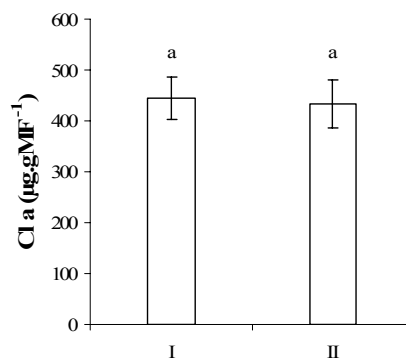


Figura 9. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*. I = extração a partir de 300 mg de massa fresca e II = extração a partir de 120 mg de massa fresca, fórmula modificada de Jeffrey & Humphrey (1975). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Uma vez que não houve diferenças nas concentrações de ficoeritrina, ficocianina e clorofila *a* com o uso de 300 mg ou 120 mg de massa fresca de alga, optou-se por utilizar

120 mg de massa fresca nas demais extrações. A redução da quantidade de massa fresca é vantajosa em estudos fisiológicos e bioquímicos, pois comumente trabalha-se apenas com os ápices das algas ou porções de tecido específico (ex. meristemático ou reprodutivo), requerendo, assim, menor tempo de cultivo para atingir a massa fresca necessária.

Em seguida, após da extração das ficobiliproteínas, foram avaliados diferentes solventes para a extração de clorofila *a*. Foram empregadas as fórmulas modificadas apresentadas na Tabela V, propostas para rodófitas. A concentração de clorofila *a* foi maior quando foram empregados acetona 90%, acetona 80%, DMF ou metanol, independentemente da fórmula usada, sendo que a única diferença significativa encontrada foi entre os tratamentos com acetona 80% e fórmula modificada de Wellburn (1994) e com DMF e fórmula modificada de Inskeep & Bloom (1985) ($p = 0,0399$) (Figura 10). Os solventes menos eficientes foram acetona 80% tamponada e DMSO ($p = 0,5704$) (Figura 10).

A concentração de clorofila *a* extraída com acetona 80% apresentou maior variação que os demais tratamentos e a extraída em metanol, apesar de estatisticamente semelhante, foi menor que o conteúdo observado com extração em acetona 90% ou DMF (Figura 10). Além disso, alguns autores apontam que o metanol, embora seja um solvente eficiente para a extração de clorofila, aumenta a degradação deste pigmento por romper o anel isocíclico (Porra, 2002) e causar a perda do íon de magnésio (Ritchie, 2008) presente na molécula de clorofila. Dessa forma, os resultados apresentados indicam que a quantificação de clorofila *a* de *Gp. tenuifrons* seria mais eficiente empregando-se acetona 90% ou DMF na extração. A fórmula descrita por Jeffrey & Humphrey (1975) é amplamente usada quando se emprega acetona 90% para a extração de clorofila *a*. Porém, essa fórmula é antiga e diversos trabalhos apontam que o coeficiente de extinção usado para desenvolver essa fórmula foi superestimado devido à imprecisão do equipamento existente na época (Porra *et al.*, 1989; Porra, 2002). Assim, a elevada concentração de clorofila *a* observada utilizando-se este solvente poderia ser decorrente do erro inerente à fórmula devido ao coeficiente de extinção e não de uma extração mais eficiente com acetona 90%. Com isso, e também pelo fato de que vários autores apontam o DMF como um solvente muito eficiente, principalmente para a extração de clorofila de tecidos resistentes, optou-se por usar DMF nas extrações seguintes. Além disso, este solvente tem sido empregado em trabalhos mais recentes (Poppe *et al.*, 2002; Korbee *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2006, Xu & Gao, 2008).

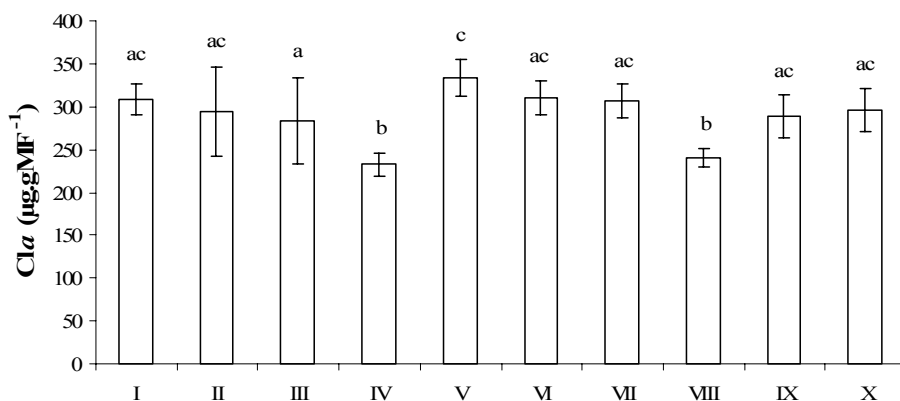


Figura 10. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*, extraída com diferentes solventes orgânicos e utilizando-se diferentes equações (Tabela V). I = extração em acetona 90% e fórmula de Jeffrey & Humphrey (1975), II = extração em acetona 80% e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), III = extração em acetona 80% e fórmula de Wellburn (1994), IV = extração em acetona 80% tamponada e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), V = extração em DMF e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), VI = extração em DMF e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), VII = extração em DMF e fórmula de Wellburn (1994), VIII = extração em DMSO e fórmula de Wellburn (1994), IX = extração em metanol e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002) e X = extração em metanol e fórmula de Wellburn (1994). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, utilizando-se DMF, foi analisada a concentração de clorofila *a* após extração do material já triturado (como no protocolo original), após as algas intactas permanecerem incubadas no solvente por 3 h e após as algas trituradas permanecerem no solvente por 3 h. Este teste teve o intuito de avaliar se havia diferença entre a extração de clorofila *a* de material triturado ou intacto e se o contato do solvente por um maior tempo com o material já triturado aumentaria a extração do pigmento. O tempo de 3 h foi escolhido porque a imersão do material no solvente por um tempo prolongado pode causar degradação oxidativa da clorofila (Porra, 2002; Hagerthey *et al.*, 2006). O material triturado e as algas incubadas por 3 h apresentaram concentrações de clorofila *a* semelhantes entre si, independentemente da fórmula usada ($p > 0,2396$) (Figura 11). O material triturado que permaneceu no solvente por 3 h, usando a fórmula modificada de Inskeep & Bloom (1985) foi o que apresentou a maior concentração de clorofila *a* (Figura 11). Esta foi semelhante à concentração encontrada nos materiais triturados que permaneceram no solvente por 3 h, usando as fórmulas modificadas de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002) ou de Wellburn (1994) ($p > 0,1458$) (Figura 11). Estes, porém, também foram semelhantes aos demais tratamentos. A única diferença observada foi entre a concentração de clorofila *a* das algas incubadas por 3 h, usando a fórmula modificada de

Wellburn (1994) e a concentração do material triturado e posteriormente incubado por 3 h, aplicando a fórmula modificada de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), sendo maior neste último ($p = 0,0402$) (Figura 11). Portanto, não houve diferença entre o material triturado ou intacto e a concentração de clorofila *a* do material triturado e incubado foi superior àqueles apenas empregando-se a fórmula de Inskeep & Bloom (1985). Apesar de semelhante estatisticamente aos demais tratamentos, optou-se por analisar a concentração de clorofila *a* após as algas trituradas permanecerem no solvente por 3 h nos demais experimentos, uma vez que isto poderia trazer resultados mais satisfatórios (Porra, 2002).

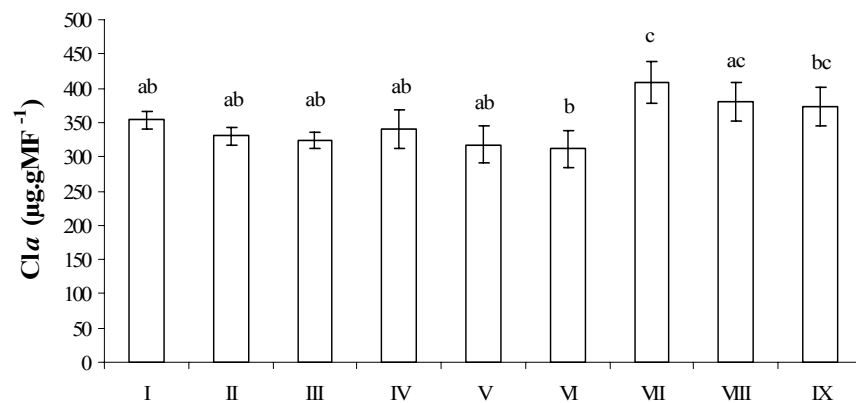


Figura 11. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$) de *Gracilariopsis tenuifrons*, extraída com DMF e utilizando-se diferentes equações (Tabela V). I = trituração e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), II = trituração e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), III = trituração e fórmula de Wellburn (1994), IV = algas intactas mantidas no solvente por 3 h e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), V = algas intactas mantidas no solvente por 3 h e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), VI = algas intactas mantidas no solvente por 3 h e fórmula de Wellburn (1994), VII = trituração + extrato mantido no solvente por 3 h e fórmula de Inskeep & Bloom (1985), VIII = trituração + extrato mantido no solvente por 3 h e fórmula de Porra *et al.* (1989)/Porra (2002), IX = trituração + extrato mantido no solvente por 3 h e fórmula de Wellburn (1994). Barras indicam intervalo de confiança. Letras distintas designam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tendo em vista os resultados apresentados, foi estabelecido para os próximos experimentos a utilização de 120 mg de massa fresca de alga para a extração de pigmentos fotossintetizantes. A trituração, em nitrogênio líquido, e extração do material serão feitas em penumbra. Será empregado tampão fosfato de sódio 50 mM de pH 5,5 para a extração de ficobiliproteínas e o material sedimentado após a centrifugação do extrato contendo as ficobiliproteínas será ressuspensionado em DMF e permanecerá em repouso por 3 h, a 4 °C, para a extração da clorofila *a*. Foram selecionadas as fórmulas descritas por Beer & Eshel (1985) para a quantificação de ficoeritrina e ficocianina, pois elas não são sensíveis a

componentes não ficobiliprotéicos presentes no extrato. Como não houve diferença entre as fórmulas empregadas para a quantificação de clorofila *a* extraída em DMF, a fórmula descrita por Inskeep & Bloom (1985) (Tabela V) foi escolhida para a determinação da concentração desse pigmento.

Referências Bibliográficas

- ANDRIA, J.R., VERGARA, J.J. & LLORENS, L.P. 1999. Biochemical responses and photosynthetic performance of *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) from Cádiz, Spain, cultured under different inorganic carbon and nitrogen levels. *Eur. J. Phycol.* 34: 497-504.
- BIRD, K.T., HABIG, C. & DEBUSK, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18: 344-348.
- BEER, S. & ESHEL, A. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 36(6): 785-792.
- CHOW, F.F. 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 136 p.
- COSTA, V.L. 2005. Diversidade intraespecífica em gametófitos de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): efeitos fisiológicos da concentração de nitrato no meio de cultura. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 100 p.
- DE MARSAC, N.T., MAZEL, D., DAMERVAL, T., GUGLIELMI, G., CAPUANO, V. & HOUMARD, J. 1988. Photoregulation of gene expression in the filamentous cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601: light-harvesting complexes and cell differentiation. *Photosyn. Res.* 18: 99-132.
- FIGUEROA, F.L., AGUILERA, J., JIMÉNEZ, C., VERGARA, J.J., ROBLES, M.D. & NIELL, F.X. 1995. Growth, pigment synthesis and nitrogen assimilation in the red alga *Porphyra* sp. (Bangiales, Rhodophyta) under blue and red light. *Sci. Mar.* 59: 9-20.
- FIGUEROA, F.L., SALLES, S., AGUILERA, J., JIMÉNEZ, C., MERCADO, J., VIÑEGLA, B., FLORES-MOYA, A. & ALTAMIRANO. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigment in the red alga *Porphyra leucostica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 81-90
- FIGUEROA, F.L., SANTOS, R., CONDE-ÁLVAREZ, R., MATA, L., PINCHETTI, J.L.G., MATOS, J., HUOVIEN, P., SCHUNHOFF, A. & SILVA, J. 2006. The use of chlorophyll fluorescence

- for monitoring photosynthetic condition of two tank-cultivated red macroalgae using fishpond effluents. *Bot. Mar.* 49: 275-282.
- GÁRCIA-SÁNCHEZ, M.J., FERNÁNDEZ, J.A. & NIELL, F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plant.* 88: 631-637.
- GEIDER, R.J. & OSBORNE, B.A. 1992. Measuring photosynthetic pigments. *In*: GEIDER, R.J. (ed). *ALGAE PHOTOSYNTHESIS: THE MEASUREMENT OF ALGAE EXCHANGE*. Springer Publishing Company. pp 107-121.
- HAGERTHEY, S.E., LOUDA, J.W. & MONGKRONTRI, P. 2006. Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll *a* determination and chemotaxonomic assessment. *J. Phycol.* 42: 1125-1136.
- INSKEEP, W.P & BLOOM, P.R. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483-485.
- JEFFREY, S.W. & HUMPHREY, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.
- KORBEE, N., FIGUEROA, F.L. & AGUILERA, J. 2005. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucostica* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem Photobiol B, Biol.* 80: 71-78.
- KÜPPERS, J.A. & WEIDNER, M. 1980. Seasonal variation of enzyme activities in *Laminaria hyperborean*. *Planta* 148: 22-230.
- KURSAR, T.A. & ALBERTE, R.S. 1983. Photosynthetic unit organization in a red alga. Relationships between light-harvesting pigments and reaction centers. *Plant Physiol.* 72: 409-414.
- KURSAR, T.A., VAN DER MEER, J. & ALBERTE, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analysis of pigment mutations. *Plant Physiol.* 73: 353-360.
- LAPOINTE, B.E. & DUKE, C.S. 1984. Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* 20: 488-495.
- LICHTENTHALER, H.K. & BUSCHMANN, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr. Prot. Food Anal. Chem.* F4.3.1-F4.3.8.

- LOPES, P.F., OLIVEIRA, M.C. & COLEPICOLO, P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 33: 225-231.
- MARTINS, A.P. 2007. Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacq.) J.V. Lamour (Gigartinales, Rhodophyta). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica de São Paulo. 118 p.
- OLIVEIRA, E.C. 2003. INTRODUÇÃO À BIOLOGIA VEGETAL. Edusp. 2ª ed. pp 144-149.
- POPPE, E., HANELT, D. & WIENCKE, C. 2002. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the antarctic red alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. *Bot. Mar.* 45: 253-261.
- PORRA, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosyn. Res.* 73: 149-156.
- PORRA, R.J., THOMPSON, W.A. & KRIEDEMANN, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan. 6ª ed. pp. 124-151.
- RITCHIE, R.J. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c* and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46: 115-126.
- SAMPATH-WILEY, P. & NEEFUS, C.D. 2007. An improved method for estimating R-phycoerithrin and R-phycoyanin contents from crude aqueous extracts of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 19:123-129.
- VERGARA, J.J., BIRD, K.T. & NIELL, F.X. 1995. Nitrogen assimilation following NH₄⁺ pulses in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: effect on C metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 253-263.
- WELLBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313.

- XU, J. & GAO, K. 2008. Growth, pigments, UV-absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. *J. Appl. Phycol.* 20(5): 681-686.
- YOKOYA, N.S., NECCHI JR, O., MARTINS, A.P., GONZALEZ, S.F. & PLASTINO, E.M. 2007. Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerithrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 19: 197-205.
- ZAR, J.H. 1999. *BIostatistical Analysis*. 4th. Edition. Prince Hall, NJ. 663 p.