

Ensaio *in vitro* da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)¹

ALINE P. MARTINS², FUNGYI CHOW³ e NAIR S. YOKOYA²

(recebido: 07 de agosto de 2008; aceite: 08 de julho de 2009)

ABSTRACT – (*In vitro* assay of nitrate reductase enzyme and effect of nitrate and phosphate availability in colour strains of *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)). The enzyme nitrate reductase (NR) catalyzes the reduction of nitrate to nitrite and controls the rate of nitrate assimilation. The *in vitro* assay of NR was optimized for the wild strain (brown, MA), and the phycoerythrin-deficient strain (light-green, VC) of *Hypnea musciformis*. Both strains were cultured at temperature of 23 ± 2 °C, photoperiod of 14 h, irradiance of 60-90 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, with medium composed by sterilized seawater (salinity 30 psu) with 50% von Stosch's enrichment solution (VSES/2). The optimal conditions for *in vitro* assay of NR were: 40 μM of NADH; 10 min of incubation of crude extracts (EB), and 100 μL of EB to both strains. Optimal activity of NR occurred at 4 and 2 mM of nitrate to the VC and MA strains, respectively. The VC and MA strains showed, respectively, Michaelis-Menten constants (K_M) for NADH of 0.2068 and 0.0837 μM , and K_M for nitrate of 0.0492 and 0.0294 mM. The results indicate that the NR of MA strain has higher affinity by the substrate than the NR of VC strain of *H. musciformis*. Experiments on the effects of availabilities of nitrate (5 to 105 μM) and nitrate and phosphate (0.5 to 25.5 μM , with a N:P relation of 4:1) showed that NR activity of VC and MA strain did not increase with the addition of nitrate to the medium, what can be related with their nutritional state. The NR activity was higher in treatments with phosphate addition than those with only nitrate addition, indicating that this nutrient is important to metabolic processes related to the NR activity.

Key words - colour strain, *Hypnea*, nitrate, nitrate reductase, phosphate

RESUMO – (Ensaio *in vitro* da enzima nitrato redutase e efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta)). A enzima nitrato redutase (NR) catalisa a redução do nitrato a nitrito e controla a taxa de assimilação do nitrato. O ensaio *in vitro* da nitrato redutase foi otimizado para a linhagem selvagem (marrom, MA) e para a linhagem deficiente em ficoeritrina (verde-clara, VC) de *Hypnea musciformis*. As duas linhagens foram cultivadas em temperatura de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 horas, irradiância de 60-90 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e meio composto por água do mar esterilizada (30 ups) enriquecida com a solução de von Stosch na concentração de 50% (VSES/2). As condições ótimas de ensaio para ambas as linhagens foram: 40 μM de NADH; 10 min de incubação do extrato bruto (EB) e 100 μL de EB. A atividade ótima da NR ocorreu em 4 e 2 mM de nitrato para a linhagem VC e MA, respectivamente. As linhagens VC e MA apresentaram, respectivamente, constante aparente de Michaelis-Menten (K_M) para NADH de 0,2068 e 0,0837 μM , e K_M para nitrato de 0,0492 e 0,0294 mM. Os resultados indicam que a NR da linhagem MA tem maior afinidade pelo substrato do que a NR da linhagem VC de *H. musciformis*. Os experimentos para avaliar os efeitos da disponibilidade de nitrato (5 a 105 μM) e nitrato e fosfato (0,5 a 25,5 μM , com a relação N:P de 4:1) mostraram que a atividade da NR das linhagens VC e MA não aumentou com a adição de nitrato no meio, o que pode estar relacionado com o estado nutricional dessas algas. A atividade da NR foi maior nos tratamentos com adição de fosfato do que naqueles com adição de apenas nitrato, indicando que esse nutriente é importante para os processos metabólicos relacionados a atividade da NR.

Palavras-chave - fosfato, *Hypnea*, linhagens de cor, nitrato, nitrato redutase

Introdução

A assimilação do nitrato é o principal processo pelo qual o nitrogênio inorgânico é convertido à forma

orgânica e este processo ocorre em uma variedade de organismos como bactérias, leveduras, fungos, algas, briófitas e plantas vasculares. A regulação da assimilação do nitrato tem sido foco de muitos estudos, uma vez que a intervenção e o melhoramento da eficiência desse processo limitante do crescimento podem levar ao aumento da produtividade na agricultura (Solomonson & Barber 1990).

A primeira etapa da assimilação do nitrato ocorre no citoplasma, sendo catalisada pela enzima nitrato redutase (NR), que reduz o nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) utilizando NAD(P)H como doador de elétrons. Posteriormente, o

1. Parte da dissertação de mestrado da primeira autora. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica.
2. Instituto de Botânica, Seção de Ficologia, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.
3. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Rua do Matão, Trav. 14, nº 321, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil.
4. Autor para correspondência: alinepater@hotmail.com

nitrito produzido é transportado ao cloroplasto, onde é reduzido ao íon amônio pela enzima nitrito redutase (NiR), que utiliza a ferredoxina como doadora de elétrons (Lea 1993).

Considera-se que a NR, por ser a primeira enzima da via de redução do nitrato, controla a sua taxa de assimilação do nitrato, constituindo um fator importante na regulação do crescimento, desenvolvimento e produção de proteínas (Solomonson & Barber 1990).

Os ensaios para avaliar a atividade enzimática da NR podem ser realizados *in situ* ou *in vitro*. No primeiro caso, a enzima não é extraída do interior da célula. A membrana da célula é artificialmente permeabilizada para permitir a difusão do nitrito produzido ao meio como produto da ação da NR. Em geral, tal método é menos controlado e mais difícil de reproduzir, uma vez que os substratos podem estar presentes em quantidades não saturantes (Berges 1997), subestimando a atividade da enzima.

O ensaio *in vitro* pressupõe a extração da enzima do interior da célula em um tampão que permite a manutenção da estabilidade da atividade enzimática. Para isto, duas questões devem ser levadas em consideração: i) manutenção da integridade da atividade enzimática durante a extração e o ensaio, uma vez que pode ocorrer a perda de cofatores enzimáticos durante a extração (Vennesland & Solomonson 1972), a degradação da enzima por proteases endógenas (Berges & Harrison 1995) e a inibição da atividade por compostos fenólicos ou outras substâncias inibitórias (Thomas & Harrison 1988). ii) realização do ensaio sob condições ótimas de atividade, que são espécies-específicas (Lobban & Harrison 1994) e requerem condições apropriadas como pH, temperatura e concentração de substrato (Berges 1997, Chow *et al.* 2004, Granbom *et al.* 2004, Chow *et al.* 2007). A adição de albumina sérica bovina (BSA) no tampão de extração pode ajudar a preservar a proteína e a atividade da NR, uma vez que este composto atua como substrato preferencial para as proteases endógenas e liga-se aos compostos fenólicos (Ingemarsson 1987, Chow *et al.* 2004).

Com base no ensaio *in vitro* da NR descrito para *Fucus gardneri* P. C. Silva foram determinadas as atividades da NR de outras espécies de macroalgas marinhas (*Macrocystis integrifolia* Bory, *Costaria costata* (C. Agardh) D. A. Saunders, *Ulva* sp., *Porphyra* sp. e *Corallina vancouveriensis* Yendo) (Hurd *et al.* 1995) e, embora a atividade da NR tenha sido detectada em todas as espécies testadas, houve uma grande variação nos valores apresentados, o que pode estar relacionado a diferenças inter-específicas ou ao fato do protocolo

utilizado não ser completamente adequado para a espécie em questão.

A caracterização da atividade da NR tem sido realizada para diversas macroalgas, como para as rodófitas *Gracilaria caudata* J. Agardh (Chow *et al.* 2007), *G. tenuistipitata* var. *liui* Zhang *et al.* (Lopes *et al.* 1997), *G. chilensis* C. J. Bird, McLachlan & E. C. Oliveira (Chow *et al.* 2004), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva (Granbom *et al.* 2004) e *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommers (Rossa 1999). Ao comparar os valores de K_M para nitrato de *G. caudata* (3,95 mM) (Chow *et al.* 2007) e *G. chilensis* (0,68 mM) (Chow *et al.* 2004), pode-se observar que a NR de *G. caudata* possui menor afinidade pelo substrato.

A presença de nitrato no meio pode estimular a atividade da NR. Davison & Stewart (1984) observaram que a atividade enzimática de espécimes maduros de *Laminaria digitata* (Huds.) J. V. Lamour. aumentou em altas concentrações de nitrato, sendo o mesmo observado para *L. saccharina* (L.) J. V. Lamour. (Wheeler & Weidner 1983). Entretanto, a atividade da NR de esporófitos jovens de *L. digitata* manteve-se constante com a variação das concentrações de nitrato testadas (Davison & Stewart 1984). O fosfato também estimula a atividade da NR, embora uma parte do seu efeito possa ser resultado de um incremento na força iônica, quando esse fator não é adequadamente controlado (Nicholas & Scawin 1956, Huber *et al.* 1994).

Uma vez que os métodos descritos na literatura para o ensaio *in vitro* da NR não são igualmente adequados para as diferentes espécies de macroalgas e considerando a importância do nitrogênio e fosfato na atividade enzimática, o presente trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo para avaliar a atividade da NR em duas linhagens de cor de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. e avaliar os efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato na atividade enzimática e no conteúdo de proteínas solúveis totais.

Material e métodos

Linhagens estudadas – O estudo foi realizado com a linhagem selvagem (marrom, MA) e a linhagem deficiente em ficoeritrina (verde-clara, VC) da espécie *Hypnea musciformis*. Um espécime tetrasporofítico de coloração marrom com somente um ramo lateral verde foi coletado pela Dra. Noemy Yamaguishi-Tomita em 1994, na Ponta da Baleia, Espírito Santo. As linhagens verde-clara (VC) e marrom (MA) originaram-se a partir do isolamento e da propagação *in vitro* do ramo verde e dos ramos marrons, respectivamente.

Exemplares de ambas linhagens de *H. musciformis* foram depositados no Herbário do Instituto de Botânica (SP), sob os números SP365645 (VC) e SP365646 (MA).

Culturas unialgáceas de *Hypnea musciformis* – As linhagens VC e MA de *H. musciformis* foram cultivadas em água do mar acrescida com 50% da solução de enriquecimento de von Stosch (VSES/2), com as concentrações das vitaminas (tiamina, biotina e cianocobalamina) reduzidas a 50% (Yokoya 1996). O meio de cultivo foi renovado semanalmente e as culturas foram submetidas a uma temperatura média de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 horas, salinidade de 30-32 ups, pH 8 e densidade de fluxo fotônico de 60 a 90 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Otimização do ensaio *in vitro* da NR – Parâmetros testados: Para a otimização do ensaio *in vitro* da NR das duas linhagens de *H. musciformis* foram testados os seguintes parâmetros: extrato bruto (EB) com ou sem albumina sérica bovina (BSA; 0,3% w/v); tempo (5, 10 e 15 min) e temperatura (5 a 35 °C) de incubação do extrato bruto; volume de extrato bruto incubado (10, 50, 100, 200 e 300 μL); concentração de nitrato (0 a 24 mM) e concentração de NADH (entre 0 e 60 μM). A estabilidade da enzima também foi analisada após 1 e 7 dias de armazenamento do material algáceo sob -20 e -80 °C. Na temperatura de -20 °C também foi testada a condição de -20 °C com gelo seco.

Extração celular e ensaio *in vitro* da NR – A extração celular e o ensaio da NR foram realizados modificando-se o protocolo descrito por Chow *et al.* (2004), a partir de material algáceo congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até o momento da análise. A extração celular foi realizada por meio da trituração das amostras em nitrogênio líquido. O material triturado foi suspenso em um tampão de extração (0,2 M tampão fosfato; pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,3% w/v BSA) na proporção de 1 g de biomassa fresca por 10 mL de tampão. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 g e 4 °C, e o sobrenadante (extrato bruto) foi retirado e mantido no gelo. Para a determinação da atividade da NR, o extrato bruto foi pré-incubado em uma mistura de reação composta por 0,2 M tampão fosfato, pH 8, 4 mM KNO_3 e 0,5 mM MgSO_4 , por 10 minutos. A mistura foi incubada por um tempo adicional de 10 minutos após a adição de 40 μM de NADH para iniciar a reação. Um controle foi feito sem a adição de NADH. A reação foi interrompida adicionando 1,4 mM de ZnSO_4 e 43% de etanol v/v. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 g e 20 °C. A concentração de nitrito foi determinada por espectrofotometria pela absorção a 543 nm após a adição de 9,6 mM sulfanilamida e 0,7 mM n-(1-naftil) etilendiamina diidrocloreto. Assim que o valor ótimo para cada parâmetro foi determinado para cada linhagem, o mesmo foi substituído no ensaio enzimático a fim de aprimorar a eficiência do ensaio da atividade da NR. O conteúdo de nitrito produzido foi transformado em atividade da NR por massa fresca considerando que 1 unidade da NR (U) corresponde a 1 μmol

$\text{NO}_2^- \text{min}^{-1}$ (Chapman & Harrison 1988) sob uma temperatura ótima de ensaio de 30 °C.

As constantes aparentes de saturação média (K_M) para NADH e nitrato foram calculadas mediante regressão linear segundo o método descrito por Leatherbarrow (1990) utilizando o programa ENZFITTER 1.05. Os valores de K_M foram determinados utilizando extratos brutos dialisados por 4 horas, por meio de um kit de diálise Cellu-Sep com membranas do tipo MWCO 6.000-8000, de 28 μm de porosidade.

Experimentos com diferentes concentrações de nitrato e fosfato – Foi realizado um pré-tratamento onde as algas foram cultivadas em água do mar esterilizada sem adição de nutrientes durante duas semanas que antecederam o início dos experimentos. Esse experimento foi realizado utilizando água do mar esterilizada (concentração inicial de nutrientes: 5 μM de nitrato e 0,5 μM de fosfato) enriquecida com diferentes concentrações de nitrato (NaNO_3 ; 5, 25, 45, 65, 85 e 105 μM) e com diferentes concentrações de nitrato (NaNO_3 ; 5, 25, 45, 65, 85 e 105 μM) e fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,5, 5,5, 10,5, 15,5, 20,5 e 25,5 μM), mantendo a proporção 4:1 de nitrogênio:fósforo (N:P). Estes valores correspondem às concentrações de nitrato e fosfato presentes na água do mar mais as concentrações adicionadas. Após o pré-tratamento, as algas foram incubadas nos respectivos tratamentos por 28 dias (troca de meio semanal), sendo analisados a atividade da NR e o conteúdo de proteínas solúveis totais ao final do período de incubação.

Para garantir a preservação do mesmo estágio fisiológico determinado pelo tratamento estudado e a sensibilidade da enzima NR ao ensaio *in vitro*, a última troca do respectivo meio foi realizada 24 horas antes do congelamento de cada amostra, cujo horário foi padronizado e realizado às 12h00.

A análise da NR foi realizada conforme descrito no item “otimização do ensaio *in vitro* da NR”, com as seguintes condições otimizadas: adição de BSA (0,3% w/v); 40 μM de NADH; 4 mM de nitrato; 100 μL de extrato bruto incubado por 10 minutos a 30 °C.

Para a determinação da proteína solúvel total, utilizou-se uma alíquota do extrato bruto obtido na extração da NR, que foi separada antes da adição de BSA. O conteúdo de proteína solúvel total foi determinado por espectrofotometria a 595 nm após a adição da solução de Coomassie Blue (Bio-Rad), segundo o método de Bradford (1976).

Análises estatísticas – Todos os experimentos foram realizados com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, e ANOVA de dois fatores, seguido do teste de comparação de Student-Newman-Keuls, considerando-se um limite de confiança de 95%. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa SigmaStat (versão 1.0).

Resultados

Otimização do ensaio *in vitro* da NR, extrato bruto (EB) com e sem BSA – Não houve diferença significativa na atividade da NR de ambas as linhagens nos EB com e sem BSA (figura 1). No entanto, optou-se por adicionar BSA no tampão de extração para os posteriores ensaios a fim de garantir a estabilidade da enzima.

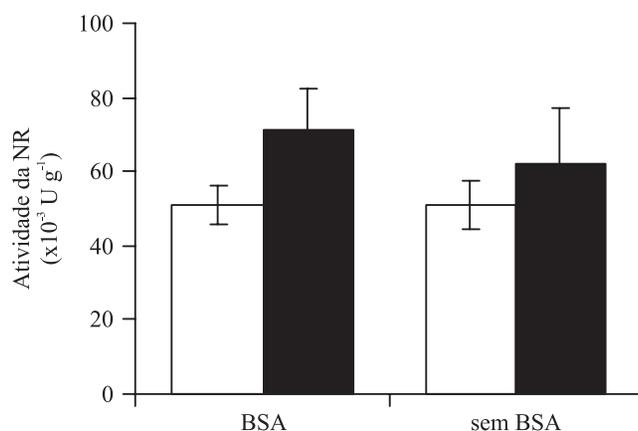


Figura 1. Variação da atividade da nitrato redutase (NR) em extratos brutos com e sem adição de albumina sérica bovina (BSA) nas linhagens verde-clara (VC, coluna branca) e marrom (MA, coluna preta) de *Hypnea musciformis*.

Figure 1. Activity of nitrate reductase (NR) in crude extracts with and without bovine serum albumin (BSA) in the light-green strain (VC, white column) and brown strain (MA, black column) of *Hypnea musciformis*.

Tempo de incubação – Houve um incremento linear na atividade da NR da linhagem verde-clara (VC) com o aumento do tempo de incubação (figura 2A), sendo que o aumento foi significativo de 5 para 10 min, porém de 10 para 15 minutos não houve diferença significativa na atividade enzimática (figura 2A). Portanto, o tempo de incubação escolhido para os ensaios seguintes foi 10 minutos. A atividade da NR da linhagem marrom (MA) também foi proporcionalmente menor em 5 minutos e maior em 10 e 15 minutos (figura 2A).

Volume de EB – A NR da linhagem VC apresentou maior atividade em 100 μ L de EB incubado enquanto que a da MA foi maior em 300 μ L (figura 2B). Ao comparar a atividade entre as duas linhagens, a atividade da NR da linhagem MA foi significativamente maior do que a da VC apenas no volume de incubação de 300 μ L de EB. Entretanto, os resultados apresentados pela linhagem MA na incubação com 300 μ L de EB apresentaram

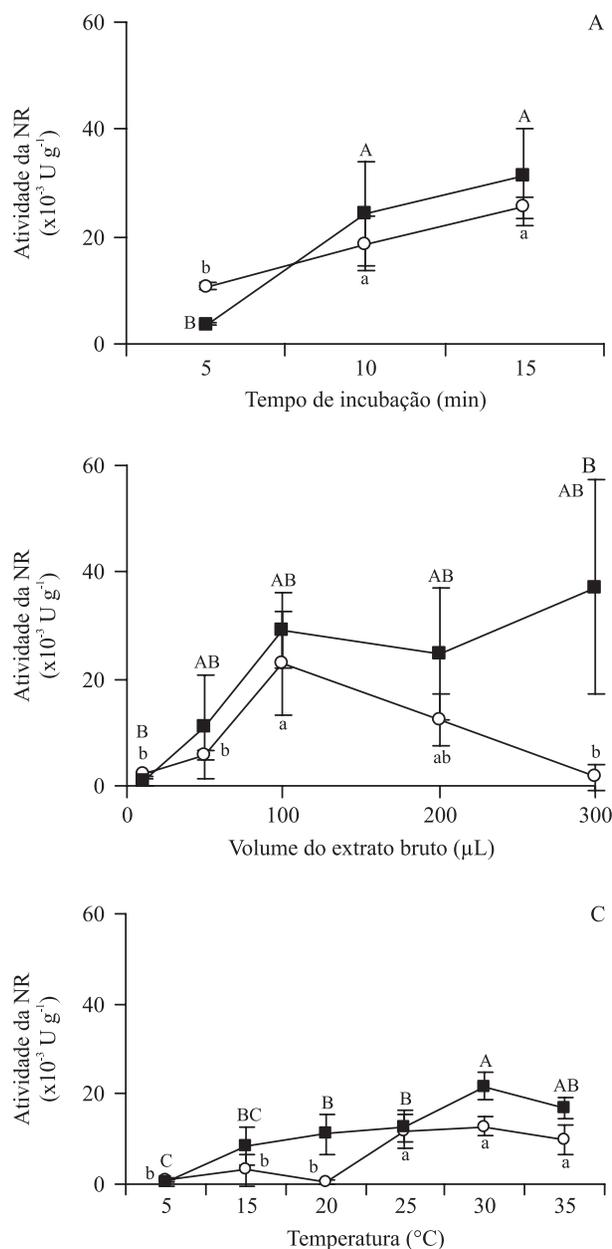


Figura 2. Variação da atividade da nitrato redutase (NR) em extratos brutos das linhagens verde-clara (VC, círculo branco) e marrom (MA, quadrado em preto) de *Hypnea musciformis* incubados em diferentes tempos (A), volumes (B) e temperaturas (C). Tratamentos com letras distintas (VC, minúsculas; MA, maiúsculas) são significativamente diferentes entre si, segundo ANOVA de um fator e teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

Figure 2. Activity of nitrate reductase (NR) in crude extracts of light-green strain (VC, white circle) and brown strain (MA, black square) of *Hypnea musciformis* incubated in different time (A), volumes (B) and temperatures (C). Treatments marked by distinct letters (VC, lower case letter; MA, capital letter) are significantly different according to the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$).

um grande desvio padrão e, dessa forma, optou-se em utilizar o volume de 100 µL para as duas linhagens nos experimentos subsequentes.

Temperatura de incubação – A NR da linhagem VC apresentou maior atividade quando incubada nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C e a da linhagem MA foi maior em 30 e 35 °C (figura 2C). Ao comparar ambas as linhagens, a atividade da NR da linhagem MA foi maior do que a da linhagem VC nas temperaturas de 15, 20 e 30 °C. Uma vez que a atividade da NR de ambas linhagens foi maior na temperatura de incubação de 30 °C e não houve diferença significativa com a de 35 °C, optou-se pela temperatura de 30 °C para os ensaios posteriores.

Concentrações de nitrato e NADH – Ambas as linhagens apresentaram um aumento na atividade enzimática conforme o aumento da concentração do substrato (figura 3B, C e D), excetuando o extrato não dialisado, incubado com diferentes concentrações de nitrato (figura 3A). Considerando-se as curvas obtidas das amostras submetidas à diálise, as linhagens VC e MA apresentaram, respectivamente, K_M aparente para nitrato de 49,2 e 29,4 µM e para NADH de 0,2068 e 0,0837 µM, o que mostra que a NR da linhagem MA tem maior afinidade por ambos substratos do que a da linhagem VC. Para os subsequentes experimentos, optou-se pela utilização de concentrações de 4 mM de nitrato e 40 µM de NADH no ensaio enzimático.

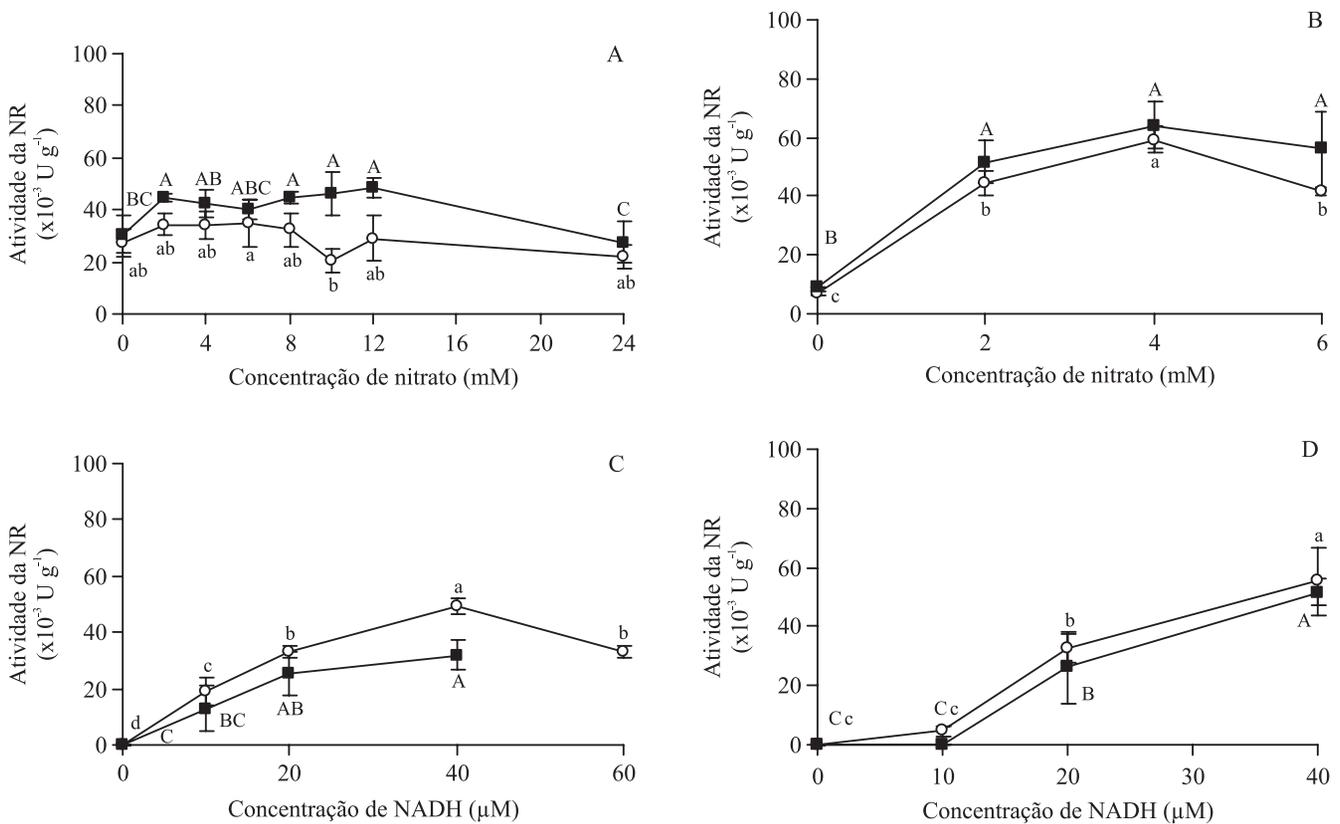


Figura 3. Variação da atividade da nitrato redutase (NR) em extratos brutos não submetidos à diálise (A e C) e submetidos à diálise (B e D) das linhagens verde-clara (VC, círculo branco) e marrom (MA, quadrado em preto) de *Hypnea musciformis* incubados em diferentes concentrações de nitrato (A e B) e NADH (C e D). Tratamentos com letras distintas (VC, minúsculas; MA, maiúsculas) são significativamente diferentes entre si, segundo ANOVA de um fator e teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

Figure 3. Activity of nitrate reductase (NR) in crude extracts, which were not submitted to dialysis (A and C) and submitted to dialysis (B and D) of light-green strain (VC, white circle) and brown strain (MA, black square) of *Hypnea musciformis* incubated in different nitrate concentrations (A and B), and NADH (C and D). Treatments marked by distinct letters (VC, lower case letter; MA, capital letter) are significantly different according to the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$).

Temperatura e tempo de armazenamento das amostras – A análise de variância bifatorial mostrou que, para ambas as linhagens, a temperatura de armazenamento não influenciou na estabilidade da NR em amostras armazenadas em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ com gelo seco e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 4). Porém, o tempo de armazenamento de uma semana ocasionou um decréscimo significativo na atividade enzimática (figura 4). Para a linhagem VC, houve decréscimo significativo na atividade da NR

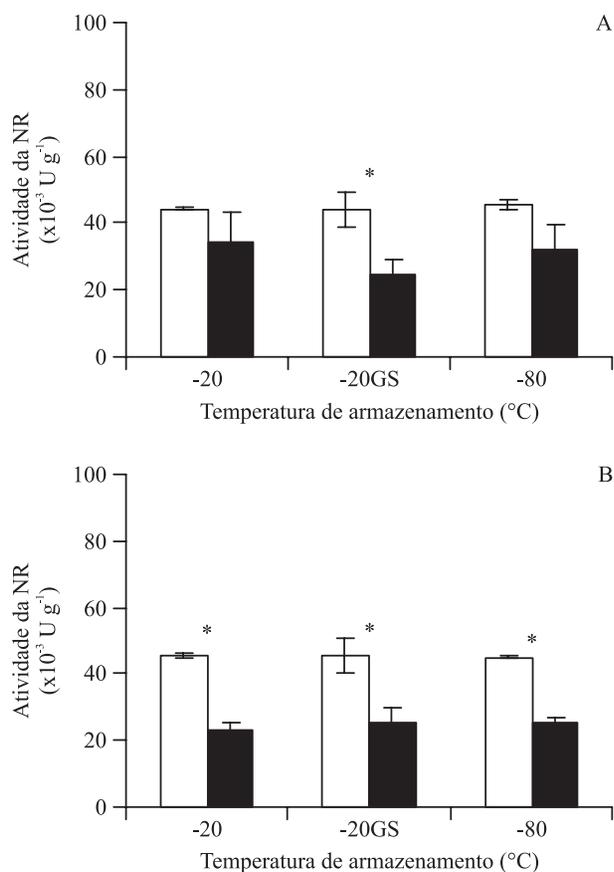


Figura 4. Variação da atividade da nitrato redutase (NR) das amostras das linhagens verde-clara (VC, A) e marrom (MA, B) de *Hypnea musciformis* estocadas em diferentes temperaturas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ + gelo seco e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 1 (coluna branca) e 7 (coluna preta) dias. * = diferenças significativas entre o tempo de armazenamento de 1 e 7 dias, segundo a ANOVA bifatorial e o teste de comparação de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Figure 4. Activity of nitrate reductase (NR) on samples of light-green strain (VC, A) and brown strain (MA, B) of *Hypnea musciformis* stored in different temperatures ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ + dry-ice and $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 1 day (white column) and 7 days (black column). * = significant differences between 1 and 7 days according ANOVA bifatorial and comparison test of Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

apenas nas amostras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ com gelo seco (figura 4A), enquanto que a atividade da NR da linhagem MA decresceu em todas as temperaturas testadas após sete dias de armazenamento (figura 4B).

Efeito da disponibilidade de nitrato e fosfato na atividade da NR – A linhagem VC apresentou maior atividade da NR no tratamento controle (sem adição de nitrato) e menor nos tratamentos com 25 a $105\text{ }\mu\text{M}$ de nitrato (figura 5A). Para a linhagem MA, a atividade da NR foi

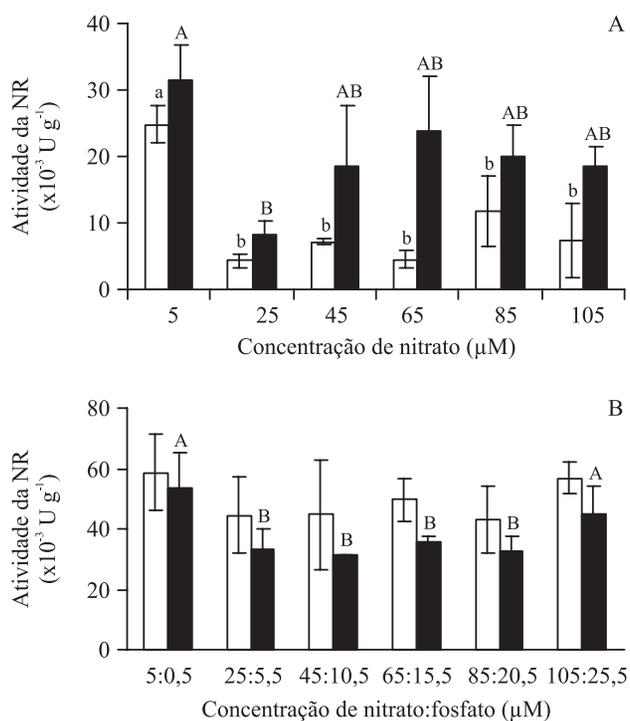


Figura 5. Variação da atividade da nitrato redutase (NR) das linhagens verde-clara (VC, coluna branca) e marrom (MA, coluna preta) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato (A) e diferentes concentrações de nitrato e fosfato (B), mantendo a relação N:P de 4:1. Tratamentos com letras distintas (VC, minúsculas; MA, maiúsculas) são significativamente diferentes entre si, segundo ANOVA unifatorial e teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

Figure 5. Activity of nitrate reductase (NR) of light-green strain (VC, white column) and brown strain (MA, black column) of *Hypnea musciformis* cultured for 28 days in sterilized seawater enriched with different nitrate concentrations (A) and nitrate and phosphate concentrations (B) with constant N:P ratio of 4:1. Treatments marked by distinct letters (VC, lower case letters; MA, capital letters) are significantly different according to the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$).

menor no tratamento com 25 μM de nitrato e não variou entre os demais tratamentos (figura 5A). A atividade da NR da linhagem MA foi maior do que a da VC no tratamento com 65 μM de nitrato.

Ao adicionar nitrato:fosfato no meio, sempre em uma proporção de 4:1 de N:P, não houve diferença significativa na atividade da NR da linhagem VC nos diferentes tratamentos testados (figura 5B). Entretanto, a atividade da NR da linhagem MA foi maior nos tratamentos controle e com 105:25,5 μM de nitrato:fosfato e menor nos demais tratamentos (figura 5B). Não houve diferença significativa entre as linhagens.

Ambas as linhagens estudadas apresentaram menor conteúdo de proteínas solúveis totais no tratamento controle e maior nos tratamentos variando de 25 a 105 μM de nitrato (figura 6A), sendo o mesmo observado com a adição de fosfato no meio (figura 6B). A linhagem MA apresentou maior conteúdo de proteínas solúveis

totais do que a linhagem VC no tratamento com 85 μM de nitrato.

Discussão

Otimização do ensaio *in vitro* da NR – Vários são os parâmetros que podem influenciar a atividade da NR no ensaio enzimático e, dessa forma, neste trabalho alguns dos fatores considerados mais importantes foram analisados para as linhagens VC e MA de *H. musciformis*.

A presença/ausência de BSA no tampão de extração não influenciou a atividade da NR de ambas as linhagens de *H. musciformis*, sendo o mesmo observado para *Fucus gardneri* (Hurd *et al.* 1995) e *Enteromorpha* sp. (Lartigue & Sherman 2002). Por outro lado, Rossa (1999) e Chow (2002) observaram um aumento significativo na atividade da NR de *Gracilariopsis tenuifrons* e *Gracilaria chilensis*, respectivamente, motivo pelo qual optou-se pela utilização de BSA nas análises subsequentes, a fim de evitar a degradação da proteína NR por proteases celulares.

Não houve diferença significativa na atividade da NR com o aumento do tempo de incubação de 10 para 15 minutos para as duas linhagens de *H. musciformis* estudadas. Portanto, foi utilizado o tempo de 10 minutos nos ensaios subsequentes. Para *G. tenuifrons*, a produção de nitrito começou a diminuir a partir de 30 minutos de incubação e a velocidade de reação foi máxima em 5 e 10 min (Rossa 1999). Para *G. chilensis*, o tempo de incubação de 5 minutos foi a melhor condição de ensaio *in vitro* da NR (Chow *et al.* 2004), enquanto que para *G. caudata* acima de 10 minutos a atividade atingia o patamar (Chow *et al.*, 2007). Um menor tempo de ensaio implica em maior velocidade catalítica da enzima para reduzir o substrato disponível, o que pode significar que *G. chilensis* possui uma maior eficiência para a redução de nitrito através da enzima NR.

As atividades da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis* foram maiores, respectivamente, em 100 e

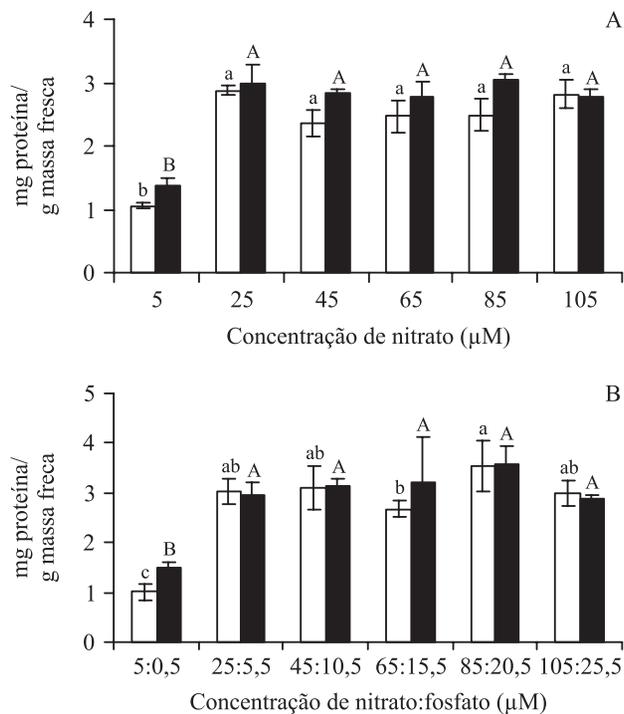


Figura 6. Variação no conteúdo de proteínas solúveis totais das linhagens verde-clara (VC, coluna branca) e marrom (MA, coluna preta) de *Hypnea musciformis* cultivadas por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato (A) e diferentes concentrações de nitrato e fosfato (B), mantendo a relação N:P de 4:1. Tratamentos com letras distintas (VC, minúsculas; MA, maiúsculas) são significativamente diferentes entre si, segundo ANOVA unifatorial e teste de comparação múltipla de Tukey ($P < 0,05$).

Figure 6. Content of total soluble protein content of light-green strain (VC, white column) and brown strain (MA, black column) of *Hypnea musciformis* cultured for 28 days in sterilized seawater enriched with different nitrate concentrations (A) and nitrate and phosphate concentrations (B) with N:P ratio of 4:1. Treatments marked by distinct letters (VC, lower case letters; MA, capital letters) are significantly different according to the one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($P < 0.05$).

300 μL de EB incubado. Para *F. gardneri*, a atividade da NR aumentou linearmente com o aumento do volume de EB incubado (Hurd *et al.* 1995). Lopes *et al.* (1997) e Rossa (1999) otimizaram o volume de EB em 100 μL para *G. tenuistipitata* e *G. tenuifrons*, respectivamente, enquanto que para *G. chilensis* (Chow *et al.* 2004) e *G. caudata* (Chow *et al.* 2007) o volume escolhido foi de 50 μL . Embora a atividade da NR da linhagem MA tenha aumentado com o aumento do volume de EB incubado, o desvio padrão das amostras incubadas com 300 μL foi maior, motivo pelo qual adotou-se o volume de 100 μL para todos os demais ensaios enzimáticos realizados no presente estudo.

As atividades da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis* foram maiores nas temperaturas de 25, 30 e 35 $^{\circ}\text{C}$. Para *G. tenuifrons* (Rossa 1999), a atividade da NR foi máxima na temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$, enquanto que para *G. chilensis* e *G. tenuistipitata* var. *liui* (Lopes *et al.* 1997) a atividade ótima ocorreu em 15 e 20 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Uma vez que a atividade da NR da linhagem MA foi maior em 30 $^{\circ}\text{C}$ e a da linhagem VC foi maior nas temperaturas entre 25 e 35 $^{\circ}\text{C}$, adotou-se 30 $^{\circ}\text{C}$ para a realização de todos os demais ensaios enzimáticos realizados no presente estudo. Essa diferença na temperatura de ensaio pode estar relacionada ao local de distribuição de cada uma das espécies, uma vez que *G. chilensis* é uma espécie de águas temperadas enquanto *H. musciformis* ocorre em regiões de águas quentes.

A concentração ótima de NADH para o ensaio da NR das linhagens estudadas de *H. musciformis* foi de 40 μM . Rossa (1999) observou que diferentes lotes de *G. tenuifrons*, que representavam fases reprodutivas e locais de distribuição diferentes, apresentaram variações quanto à concentração ótima de NADH, sendo que algas do lote 82 (gametófito masculino) e 83 (gametófito feminino), provenientes de Ubatuba, apresentaram concentrações ótimas de NADH de 0,1 e 0,15 mM, respectivamente. A concentração ótima de NADH para a atividade da NR apresentada pelas linhagens de *H. musciformis* é baixa, quando comparada às de outras algas. Para *G. tenuifrons* (Rossa 1999) e *G. tenuistipitata* (Lopes *et al.* 1997), as concentrações ótimas de NADH foram, respectivamente, 150 e 400 μM .

Há uma grande variação na constante de saturação para NADH e nitrato (Berges & Harrison 1995). O K_M aparente da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis* para o NADH foi de 0,2068 e 0,0837 μM , respectivamente. Esses valores são baixos quando comparados aos K_M de outras algas. Para *G. tenuifrons*

o valor do K_M aparente foi de 12,2 μM (Rossa 1999), para *G. tenuistipitata* foi de 95 μM (Lopes *et al.* 1997), 8 μM para *G. chilensis* (Chow *et al.* 2004) e 22 μM para *G. caudata* (Chow *et al.* 2007). Essas diferenças na concentração ótima e no valor do K_M para NADH evidenciam diferenças nos requerimentos metabólicos da NR para cada uma dessas espécies.

O K_M aparente da NR para o nitrato apresentado pela linhagem VC de *H. musciformis* (49,2 μM) foi maior do que o apresentado pela linhagem MA (29,4 μM) e por *G. tenuifrons* (31,44 μM) (Rossa 1999) e *Porphyra perforata* J. Agardh (35 μM) (Thomas & Harrison 1988), o que indica que a NR da linhagem VC possui menor afinidade pelo substrato. Porém, *G. tenuistipitata* (Lopes *et al.* 1997) e *G. chilensis* (Chow *et al.* 2004) possuem K_M maiores do que o da linhagem VC, de 197,8 e 680 μM , respectivamente. Esses dados mostram as diferenças nas afinidades da NR pelos substratos, evidenciando a necessidade de estabelecer um protocolo de ensaio enzimático específico para cada espécie.

Houve um decréscimo na atividade da NR de ambas as linhagens de *H. musciformis* com o aumento do tempo (1 a 7 dias) de armazenamento das amostras, independente da temperatura de armazenamento (-20 e -80 $^{\circ}\text{C}$). O mesmo não foi observado por Lartigue & Sherman (2002) para *Enteromorpha* sp., onde a atividade da NR foi preservada ao longo de 25 dias quando estocada à -80 $^{\circ}\text{C}$, mas não foi preservada quando estocada à -20 $^{\circ}\text{C}$.

O presente estudo evidenciou algumas diferenças na atividade da NR das linhagens de cor de *H. musciformis*, destacando-se que a NR da linhagem MA apresentou maior afinidade pelo nitrato do que a da VC. Por outro lado, a NR da linhagem VC apresentou maior estabilidade em relação ao tempo de congelamento das amostras do que a da linhagem MA.

A atividade da NR apresentada pelas linhagens MA e VC de *H. musciformis* no ensaio otimizado (com BSA; 10 min de incubação; 100 μL de EB incubado; 4 mM de nitrato; e 40 μM de NADH) foi de 40,08 e 35,05 $\times 10^{-3}$ U g^{-1} , respectivamente. Esses valores são semelhantes ou maiores do que os valores de atividade da NR apresentados por outras espécies de macroalgas em diferentes ensaios otimizados da NR *in vitro*. Por exemplo, a atividade da NR de *Ulva* sp., *C. costata*, *Porphyra* sp. (Hurd *et al.* 1995) e *G. tenuistipitata* (Lopes *et al.* 1997) foi, respectivamente, 9,3; 10,7; 4,0 e 43,3 $\times 10^{-3}$ U g^{-1} . Dentro das condições experimentais adotadas no presente estudo, os resultados obtidos indicam que foram estabelecidas as condições ótimas

para o ensaio *in vitro* da NR das linhagens VC e MA de *H. musciformis*.

Efeitos da disponibilidade de nitrato e fosfato na atividade da NR – A literatura cita que a NR é uma enzima substrato-induzível, ou seja, sua atividade é estimulada pela presença de nitrato (Berges 1997). Entretanto, os resultados apresentados pelas linhagens VC e MA de *H. musciformis* não estão de acordo com os dados da literatura, pois a atividade da NR das duas linhagens não aumentou com o incremento da disponibilidade de nitrato no meio, sendo maior no controle. Essa resposta pode ser explicada pelo estado nutricional das algas. As linhagens foram cultivadas por duas semanas em água do mar esterilizada sem adição de nutrientes, e durante esse período, as algas consumiram suas reservas, como proteínas e pigmentos, para sustentar a sobrevivência e o crescimento (Smit *et al.* 1997). Durante o experimento, as algas foram incubadas em água do mar com adição de nitrato, exceto as algas do controle, que continuaram sendo mantidas em água do mar sem adição de nutrientes. O conteúdo de proteínas das algas do controle foi muito menor do que o dos espécimes cultivados com adição de nitrato, o que mostra que enquanto os espécimes cultivados em água do mar com adição de nitrato sintetizaram e armazenaram proteínas, o metabolismo das algas do controle manteve-se em um nível basal. Ao se adicionar nitrato durante o ensaio *in vitro* da enzima, a NR dos espécimes do controle da linhagem VC foi rapidamente

estimulada, sendo que o mesmo não foi observado com a NR das algas cultivadas com adição de nitrato. Tal resposta evidencia que quando esses espécimes passam por longos períodos de limitação de nitrogênio, assim como populações de algas de regiões oligotróficas, são ativados mecanismos que possibilitam uma absorção rápida de nutrientes, quando estes se tornam disponíveis. Esse resultado corrobora com o observado por Thompson & Valieda (1999), que verificaram que pulsos de nitrato aumentaram significativamente a atividade da NR de *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek e *Gracilaria tikvahiae* McLachlan. Estes resultados podem indicar que, embora a linhagem VC de *H. musciformis* seja uma variante deficiente em ficoeritrina, sua NR pode ser eficiente em ambientes oligotróficos.

Ao comparar a atividade da NR apresentada pelas linhagens VC e MA de *H. musciformis* cultivadas em meio com apenas nitrato e com nitrato e fosfato (tabela 1), observou-se um aumento significativo na atividade enzimática com a presença de fosfato no meio, principalmente para a linhagem VC. Tem sido considerado que o fosfato estimula a atividade da NR, embora uma parte do seu efeito indutor possa ser resultado de um incremento na força iônica, quando esse fator não é adequadamente controlado (Nicholas & Scawin 1956, Huber *et al.* 1994). A estimulação do fosfato é específica para atividades de redução do nitrato e geralmente é resultado da interação do fosfato com o centro Mo-pterina (Solomonson & Barber 1990). Tais resultados mostram a importância do fósforo na atividade da NR

Tabela 1. Comparação da atividade da nitrato redutase (NR, $\times 10^{-3}$ U g⁻¹) entre os experimentos com adição apenas de nitrato e com adição de nitrato e fosfato realizados com a linhagem verde-clara (VC) e marrom (MA) de *Hypnea musciformis*, cultivada por 28 dias em água do mar esterilizada enriquecida com diferentes concentrações de nitrato e fosfato. Os valores correspondem à média e desvio padrão da variável analisada. As células com números em negrito representam as diferenças significativas entre os meios testados (com ou sem fosfato), segundo a ANOVA bifatorial e o teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Table 1. Comparison of nitrate reductase activity (NR, $\times 10^{-3}$ U g⁻¹) between experiments with addition of nitrate and addition of nitrate and phosphate performed with light-green strain (LG) and brown strain (MA) of *Hypnea musciformis* cultured for 28 days in sterilized seawater with different nitrate and phosphate concentrations. Values are mean and standard deviation. Numbers in bold are significant differences among culture media (with and without phosphate), according ANOVA bifatorial and comparison test of Student-Newman-Keuls ($P < 0.05$).

Linhagem	Tratamentos (adição de nitrato:fosfato)									
	25:0,5	25:5,5	45:0,5	45:10,5	65:0,5	65:15,5	85:0,5	85:20,5	105:0,5	105:25,5
VC	4,28 ±1,07	44,59 ±12,52	7,08 ±0,45	44,62 ±18,20	4,43 ±1,33	49,62 ±6,92	11,76 ±5,21	43,01 ±11,10	7,41 ±5,50	56,66 ±5,26
MA	8,30 ±1,98	33,03 ±6,72	18,55 ±9,11	31,09 ±0,25	23,91 ±8,09	35,59 ±1,87	19,92 ±4,76	32,53 ±4,73	18,44 ±2,94	45,22 ±8,88

das linhagens VC e MA de *H. musciformis* e evidenciam as diferenças da NR das diferentes macroalgas frente aos requerimentos nutricionais.

Agradecimentos – As autoras agradecem ao CNPq, pela concessão de auxílios e à FAPESP (processo nº 04/11459-5), pela bolsa de mestrado concedida à primeira autora.

Referências bibliográficas

- BERGES, J.A. 1997. Algal nitrate reductases. *European Journal of Phycology* 32:3-8.
- BERGES, J.A. & HARRISON, P.J. 1995. Nitrate activity quantitatively predicts the rate of nitrate incorporation under steady state light limitation: a revised assay and characterization of the enzyme in three species of marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 40:82-93.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- CHAPMAN, D.J. & HARRISON, P.J. 1988. Nitrogen metabolism and measurement of nitrate reductase activity. *In* Experimental phycology. A laboratory manual (C.S. Lobban, D.J. Chapman & B. Kremer, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, p.196-202.
- CHOW, F. 2002. Atividade *in vitro* e regulação da enzima nitrato redutase na alga vermelha *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHOW, F., OLIVEIRA, M.C. & PEDERSEN, M. 2004. *In vitro* assay and light regulation of nitrate reductase in the red alga *Gracilaria chilensis*. *Journal of Plant Physiology* 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). *Revista Brasileira de Botânica* 30:123-129.
- 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 79:65-78.
- GRANBOM, M., CHOW, F., LOPES, P.L., OLIVEIRA, M.C., COLEPICCOLO, P., PAULA, E.J. & PEDERSÉN, M. 2004. Characterization of nitrate reductase in the marine macroalga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *Aquatic Botany* 78:295-305.
- HUBER, S.C., HUBER, J.L. & KAISER, W.M. 1994. Differential response of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase-activation to inorganic and organic salts, *in vitro* and *in situ*. *Physiologia Plantarum* 92:302-310.
- 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). *Journal of Phycology* 31:835-4.
- INGEMARSSON, B. 1987. Nitrogen utilization in *Lemma*. I. Relations between net nitrate flux, nitrate reduction, and *in vitro* activity and stability of nitrate reductase. *Plant Physiology* 85:856-859.
- LARTIGUE, J. & SHERMAN, T.D. 2002. Field assays for measuring nitrate reductase activity in *Enteromorpha* sp. (Chlorophyceae), *Ulva* sp. (Chlorophyceae), and *Gelidium* sp. (Rhodophyceae). *Journal of Phycology* 38:971-82.
- LEA, P.J. 1993. Nitrogen metabolism. *In* Plant biochemistry and molecular biology (P.J. Lea & R.C. Leegood, eds.). John Wiley & Sons Ltd, p.155-180.
- LEATHERBARROW, R.J. 1990. Use of nonlinear-regression to analyse enzyme kinetic data – application to situations of substrate contamination and background subtraction. *Analytical Biochemistry* 184:274-278.
- LOBBAN, C.S. & HARRISON, P.J. 1994. Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- LOPES, P.F., OLIVEIRA, M.C. & COLEPICCOLO, P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 33:225-31.
- NICHOLAS, D.J.D. & SCAWIN, J.H. 1956. A phosphate requirement for nitrate reductase from *Neurospora crassa*. *Nature* 178:1474-1475.
- 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, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SMIT, A.J., ROBERTSON, B.L. & DU PREEZ, D.R. 1997. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. *Journal of Applied Phycology* 8:473-481.
- SOLOMONSON, L.P. & BARBER, M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:225-253.
- THOMAS, T.E. & HARRISON, P.J. 1988. A comparison of *in vitro* and *in vivo* nitrate reductase assays in three intertidal seaweeds. *Botanica Marina* 31:101-7.
- THOMPSON, S.M. & VALIEDA, I. 1999. Effect of nitrogen loading on enzyme activity of macroalgae in estuaries in Waquoit Bay. *Botanica Marina* 42:519-529.
- VENNESLAND, B. & SOLOMONSON, L.P. 1972. Nitrate reductase of *Chlorella* species or strain differences. *Plant Physiology* 49:1029-1032.

WHEELER, W.N. & WEIDNER, M. 1983. Effects of external inorganic nitrogen concentration on metabolism, growth and activities of key carbon and nitrogen assimilating enzymes of *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae) in culture. *Journal of Phycology* 19:92-96.

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