UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE
ELATERÍDEOS LUMINESCENTES: BIOLUMINESCÊNCIA,
METABOLISMO RADICALAR DE OXIGÊNIO E DIGESTÃO
EXTRA-CORPÓREA

Pio Colepicolo Neto
Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

SÃO PAULO

1986

aos meus pais, Pío e Nilce, por todo o esforço feito
e pelo sentido de liberdade, sem "quase", nunca,
interferirem nas minhas decisões

ao grande Amigo e orientador Etelvino pela
coordenação precisa e segura, quanto às discussões dos
resultados, geração de idéias e por incentivar-me,
durante esses quatro anos de trabalho conjunto.

Agradecimentos:

- à prof. Dra. Cleide Costa (MZUSP) pela colaboração nos aspectos biológicos, criação e classificação dos nossos animais.
- ao prof. Dr. Walter R. Terra (IQ-USP) por ter colocado seu laboratório à nossa disposição e pela discussão estimulante dos resultados sobre enzimas digestivas.
- ao prof. Dr. Sergio Vanin pelo companheirismo nas coletas e fornecimento das fotos deste e de outros trabalhos.
- um todo especial à Clélia, pelo auxílio nas dissecções das larvas; ao pessoal do Laboratório do prof. Lara em especial à Enny pelo auxílio na obtenção das autoradiografias; à Marisa pela ajuda nas dosagens de SOD e catalase e à equipe do MZUSP (Emilia, Denise, Adriana, Sonia e Sergio Ide) por criarem nossos elaterídeos e phengodídeos
- ao Sr. Antônio Paniago (Fazenda Santo Antônio, GO) pela gentileza de hospedar-nos durante as coletas nos Cerrados e ao Sr. Aldo Campanhã (Sítio Cambará) pelos animais adultos coletados.
- aos profs. W.D. Hastings (Harvard Univ., Biological Laboratories), E.White (Johns Hopkins Univ.) e Bruce Branchini (Univ. of Wisconsin) pelos contínuos incentivos e fornecimento de luciferinas e material para purificação da luciferase; aos Profs.

F. Tsuji (Scripps Lab., Univ. of California), M. DeLuca (Dept. of Chem. of California) e J. E. Lloyd (Univ. of Florida) pelos estímulos e sugestões.

- ao Prof. G. Cilento pelo espaço para trabalhar e a transmissão de dedicação e amor ao trabalho.

- ao Luiz R.O. Fontes (doutorando do Instituto de Biociências da USP) pela classificação dos cupins coletados nos Cerrados.

- aos maninhos; Sheila, Sidney e Solange.

- à Ana, Miguel, Memé, Adelaide, Hugo, Maju, Dulcinéia, Cornélia, Lidia, Lydia, Laura, Marisa, Gui, Bia, Meire, Carmen, Karin, Iguatemy, Mario, Klaus, Nelson, Maricilda, Jacira, Helena, Alberto, Sanches, Luciana, Lucia, Wilson, Teresa, Marta, Lique, Marisa, Lilian, Denise, Valéria, Aninha, Vani e Marcia, pelo convívio diário e amizade.

- à FINEP, FAPESP, Volkswagenwerk Stiffund e CNPq pelo apoio Financeiro, ao IBDF por tornar possível as coletas no Parque Nacional das Emas, GO e ao MZUSP pela concessão do laboratório para criação das larvas de elaterídeos.

Índice	página
Resumo	01
Abstract	03
1. Introdução	
1.1. Apresentação	05
1.2. Revisão Bibliográfica	
1.2.1. Bioluminescência	19
1.2.1.1. Bioquímica da Bioluminescência	22
1.2.1.2. Bioluminescência de Organismos Terrestres.	29
1.2.1.3. Sistema Luciferina/Luciferase de Vagalumes	32
1.2.2. Toxicidade de Oxigênio	42
1.2.3. Enzimas Digestivas de Elaterídeos Luminescentes	50
2. Objetivos da Tese	55
3. Materiais e Métodos	
3.1. Símbolos e Abreviações	58
3.2. Enzimas e Reagentes	59
3.3. Aparelhagem	61
3.4. Insetos	63

3.5. Criação de Insetos	65
3.6. Moldagem das Galerias dos Cupinzeiros	66
3.7. Estudo Espectral "in vivo"	66
3.8. Cromatografia em Camada Delgada da Luciferina .	67
3.9. Ensaios "in vitro" da Luciferase	68
3.10. Energia de Ativação da Reação Bioluminescente .	70
3.11. Biossíntese de Luciferina	
3.11.1. Aplicação do Precursor	70
3.11.2. Preparação das Amostras	72
3.11.3. Revelação das Amostras Após CCD	73
3.12. Purificação do Luminol	74
3.13. Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogênio	74
3.14. Padronização da Catalase	75
3.15. Determinação da Curva de Calibração de Soroalbumina e Ovoalbumina	
3.15.1. Absorbância a 280 nm	75
3.15.2. Biureto	76
3.15.3. Método do "Coomassie-Blue"	76
3.16. Extratos Brutos para Medidas de Atividade de Superóxido Dismutase e Catalase	78
3.17. Dosagem da Catalase Via Inibição da Reação Quimiluminescente do Luminol	79
3.18. Determinação da Atividade de Superóxido Dismutase Via Inibição da Reação Quimiluminescente do Luminol	81

3.19. Ensaio de Succinato Desidrogenase	83
3.20. Preparação das Amostras para Dosagem das Enzimas Digestivas	86
3.21. Determinação de Ativadores e Inibidores Presentes nos Tecidos do Tubo Digestivo e no Regurgitado e/ou Fluído Luminal	87
3.22. Determinação do pH ótimo de Atividade Enzimática	87
3.23. Eletroforese em Géis de Poliacrilamida	90
3.24. Isoeletrofocalização em Géis de Poliacrilamida	91
3.25. Determinação do Peso Molecular por Ultra- centrifugação em Gradiente de Densidade	92
3.26. Determinação da Constante de Michaelis-Menten	93
4. Resultados e Discussão.	
4.1. Dados Gerais de Laboratório e Campo	
4.1.1. Coleta e Criação de Elaterídeos	95
4.1.2. Observações Visuais da Bioluminescência	97
4.1.3. Os Cupinzeiros Luminescentes	99
4.2. Bioluminescência de Elaterídeos:	
Estudos Bioquímicos	
4.2.1. Resultados	109
4.2.2. Discussão	128
4.3. Metabolismo Radicalar do Oxigênio:	
4.3.1. Resultados	136
4.3.2. Discussão	144

4.4. Enzimas Digestivas	
4.4.1. Resultados	
4.4.1.1. pH do Conteúdo do Tubo Digestivo e do Material Regurgitado	149
4.4.1.2. ótimo de pH	149
4.4.1.3. Atividade Específica e Distribuição das Hidrolases nas Regiões do Tubo Digestivo ..	152
4.4.1.4. Efeito do Jejum nas Enzimas Digestivas ..	157
4.4.1.5. Propriedades Físico-Químicas das Enzimas Digestivas	160
4.4.2. Discussão	170
5. Principais Conclusões:	177
6. Bibliografia	180
Apêndice	
Aplicações Analíticas e Clínicas da Bioluminescência de Vagalumes	195

Esta tese contém dados biológicos, ecológicos e bioquímicos de quatorze espécies brasileiras de elaterídeos luminescentes, distribuídos em duas tribos. Os insetos foram coletados de vários habitats e criados em laboratório, em colaboração com pesquisadores do Museu de Zoologia da USP.

Demonstramos inicialmente que todos os elaterídeos estudados contêm a mesma luciferina de lampirídeos, independentemente da natureza da lanterna (torácica ou abdominal) e do estágio metamórfico. Estudos da biossíntese da luciferina a partir de ¹⁴C-cistina mostraram um rendimento radioquímico de síntese da ordem de 4%. Verificamos que cada espécie tem um λ_{max} de bioluminescência característico, o que pode ter importância taxonômica, especialmente no caso de larvas. Estudo físico-químico ("in vitro") da luciferase mostrou a possível existência de isozimas de luciferase nas fases da metamorfose e nas lanternas abdominal e torácica. A intensidade de emissão por ovos e larvas aumenta logaritmicamente com o aumento da temperatura absoluta, o que deve ter importância no mecanismo de caça das larvas. Ênfase especial foi dada ao *Pyrearinus termitilluminans*, espécie inquilina dos conhecidos "cupinzeiros luminescentes" encontrados no cerrado do Brasil Central e na bacia amazônica; descreve-se o processo de infestação dos cupinzeiros, usando-se observações de campo e moldagens das galerias com poliestireno.

Uma conexão interessante foi constatada entre a bioluminescência e a produção de radicais de oxigênio, acompanhada por medidas de níveis de superóxido dismutase (SOD), ao comparar-se elaterídeos luminescentes e não-luminescentes da mesma tribo e ao comparar-se os segmentos abdominais e torácicos de larvas de *Pyrearinus termitilluminans*. É também interessante notar que larvas de elaterídeos habitantes de troncos em apodrecimento (onde a concentração do oxigênio < 2%) possuem menor atividade da enzima antioxidante SOD que larvas de *Pyrearinus termitilluminans*, encontradas nas galerias aeradas dos cupinzeiros. Discute-se possíveis mecanismos de estocagem de oxigênio nas larvas luminescentes.

Finalmente descobrimos que o regurgitado injetado pelas larvas de elaterídeos nas suas presas é fortemente tamponado em pH 7,3 e contém uma mistura de proteinases (tripsina e aminopeptidase) e carbohidrases (amilase, celulase, celobiase, maltase e trealase). A injeção deste coquetel enzimático imobiliza a presa e executa digestão pré-oral. As enzimas citadas foram caracterizadas por parâmetros físico-químicos (atividade específica, pH ótimo, pI, Mw, Km e migração eletroforética relativa) e mapeadas no interior do tubo digestivo das larvas. Os dados enzimáticos são tentativamente utilizados para análise filogenética destes insetos.

Abstract

This thesis contains biological, ecological and biochemical data of fourteen species of Brazilian luminescent Elateridae (two tribes, four genera). The insects were collected in different habitats and reared from eggs in laboratory at the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Thin layer chromatography revealed that the luciferin from the elaterid species, at different stages of development and from either the thoracic or abdominal lanterns, is the same as that of Lampyridae. The radiochemical yield of luciferin biosynthesis from the precursor ¹⁴C-cystine, is ca 4%. *In vivo* and *in vitro* bioluminescence spectra are characteristic for each species and probably can be used as a tool in taxonomy, specially in the case of the larvae. Physical-chemical studies point to the possible existence of luciferase isozymes in the abdominal and thoracic lanterns of adult *Pyrophorus divergens*. The bioluminescence intensity from *Pyrearinus termitilluminans* eggs and larvae increases sharply upon increasing the temperature. We also describe the infestation process of the "luminous" termite mounds (found in the "cerrados" of Central Brazil and in the Amazonian basin) on basis of field observations and polymer-molds of the mound galleries.

There is an interesting connection between bioluminescence and the oxygen radical production when compared the levels of superoxide dismutase (SOD) and catalase (two antioxidant enzyme) in luminescent and non-luminescent elaterids. SOD levels were found to be higher in luminescent insects. For luminescent larvae, a direct correlation between SOD activity and brightness from the segments of their body was observed. In addition, larvae of *Pyrearinus termitilluminans* (inhabiting aerated galleries) have higher SOD activity than *Pyrophorus divergens* (dwelling decaying logs). These results are interpreted in terms of SOD protection against deleterious effects of active oxygen arising from storage of molecular oxygen to sustain the bioluminescent reaction.

Finally we discovered that the dark liquid regurgited by larval elaterids and injected onto their preys is highly buffered in pH 7,3 and contains a mixture of hydrolases (trypsin, aminopeptidase, amylase, cellulase, cellobiase, maltase and trehalase). The injection of this liquid immobilizes the prey and perform the pre-oral digestion. These enzymes were characterized by physico-chemical parameters (specific activity, optimum pH, pI, Mw, Km and electrophoretic relative migration) and mapped in the midgut cells. The enzymatic data is tentatively used for phylogenetical analysis of these insects.

1. Introdução

1.1. Apresentação:

Os insetos luminescentes (Coleoptera: Elateroidea e Cantharoidea), popularmente chamados nas Américas de "fireflies", "luciernagas" ou "vagalumes", têm inspirado o folclore de todas as partes do mundo, onde são citados em poemas (por exemplo, no ciclo dos mitos brasileiros sobre Curupira ou Caipora, a "Lanterna Mágica" de Cassiano Ricardo não é outra coisa se não uma lanterna de pirilampos ...

"... o próprio Curupira
ficou com pena e lhe arranjou uma lanterna
de pirilampos.
.....
Vá por aqui, direitinho,
com esta lanterna
na mão, alumando o caminho ...
e você encontrará o que procura!
E ele saiu pelo sertão,
procurando o sol da Terra
com uma lanterna de pirilampos
na mão..."

piadas, ditos populares, narrativas (por exemplo, Graça Aranha assim se expressou em "Canaã": "...Os primeiros vagalumes começavam no bojo da mata a correr suas lâmpadas divinas. No

alto, as estrelas miúdas e sucessivas principiavam também a iluminar. Os pirilampos iam-se multiplicando dentro da floresta, insensivelmente brotavam silenciosos e inumeráveis nos troncos das árvores, como se as raízes se abrissem em pontos luminosos. Serenavam aquelas primeiras ânsias da Natureza, ao penetrar no mistério da noite... ...No ar luminoso tudo retomava a fisionomia impassível. Os pirilampos já não voavam, e miríades deles cobriam os troncos das árvores, que faiscavam cravados de diamantes e topázios. Era uma iluminação deslumbrante e gloriosa dentro da mata tropical, e os fogos dos vagalumes espalhavam aí uma claridade verde, sobre a qual passavam camadas de ondas amarelas, alaranjadas e fosforescência zodiacal. E os pirilampos se incrustavam nas folhas, aqui, ali e além, mesclados com os pontos escuros, cintilavam esmeraldas, safiras, rubis, ametistas e as mais pedras que guardam parcelas das cores divinas e ternas..."

e servem também como adornos e para iluminação interna de casas (Lenko e Papavero, 1979). Frequentemente estão associados com o "espiritual" no folclore do Japão, China e América do Sul. Os insetos luminescentes pertencem a três principais famílias (Lloyd, 1978): (i) Lampyridae, cujos nomes populares são: "firefly" (USA), "luciernaga" (Espanha), "lucerna" (Portugal), "vagalume" ou "cagalume" (Brasil), "lucile" (França), "lucciola" (Itália), "ver de Saint Jean" (Bélgica), "johanniskafer" (Alemanha), "svactojanska muska" (Tchecoslováquia); constituem o grupo mais abundante e são encontrados em zonas temperadas e

tropicais; (ii) Elateridae ("click beetle", "fire beetle", "automobile bug", "cocujo", "salta martim", "tuco-tuco" e "pirilampo"), menos frequentes que os Lampyridae, são encontrados somente em regiões úmidas tropicais e sub-tropicais, e, (iii) Phengodidae ("railroad worm", "isondu" -verme de luz, "bondinho elétrico", lagarta de fogo"); menos numerosos e encontrados principalmente na América do Sul e Malásia. Frequentemente, os nomes populares dos lampirídeos derivam de "lux" (do latim, luz) ou "Sanctus Johanes", na Europa, pois revoam no mês de junho, quando festas rurais e religiosas louvam São João. Na língua Kulina, falada por tribos do Vale do Javari, os vagalumes são conhecidos com o nome de "amohuá", que também significa "estrela". Os elaterídeos, por sua vez, recebem nomes onomatopéicos que imitam o som que fazem quando colocados de pernas para o ar e pulam: "click beetle" (USA), "tec-tec" (Brasil) e "tuco-tuco" (Argentina).

Somente um gênero de coleópteros luminescentes foi citado por Herring (1978) nas famílias Homalidae e Telegeusidae. Recentemente nosso grupo descreveu uma espécie luminescente pertencente à família Staphilinidae (Costa e col., 1986) (Tabela 1). Os adultos das três principais famílias podem ser facilmente reconhecidos na natureza, à noite pela maneira com que emitem luz: (i) os lampirídeos emitem "flashes" de luz amarela dos dois ou três segmentos abdominais terminais, durante seu vôo nupcial; (ii) os elaterídeos emitem luz verde continuamente de dois órgãos luminescentes, localizados lateralmente no dorso do protórax, quando em repouso ou andando.

Tabela 1. Classificação de insetos luminescentes segundo Herring (1978).

ORDEM	SUPER FAMILIA	FAMILIA	GENEROS
Collembola		Poduridae	<i>Neanura</i>
		Onychiuridae	<i>Anuroporus</i>
Hemiptera		Fulgoridae	<i>Fulgora</i> , <i>Pyrops</i>
Coleoptera	E L A T E R O I D E A	Elateridae	80 gêneros; 17 luminescentes 97 espécies <i>Pyrophorus</i> , <i>Opseleater</i> , <i>Hapsodrilus</i> , <i>Pyrearinus</i> , <i>Phanophorus</i> , <i>Pyroptesis</i> ,...
	C A N T H A R O I D E A	Homalidae	<i>Homalidae</i>
		Telegeusidae	<i>Telegeusidae</i>
		Phengodidae	<i>Phengodes</i> , <i>Mastinocerus</i> , <i>Phrixothrix</i> , ...
		Lampyridae	> 70 gêneros; 66 espécies luminescentes <i>Photinus</i> , <i>Photuris</i> , <i>Lampyrus</i> , <i>Luciola</i> , <i>Pteroptix</i> , <i>Lucidota</i> , <i>Aspisoma</i> , <i>Diophranes</i> ,...
Diptera		Mycetophilidae	<i>Orbelia</i> , <i>Keroplatus</i> , <i>Arachnocampa</i> , etc.

(daí vem o nome "automobile bug") ou de uma lanterna ventral (amarela) quando eles voam durante a atração e corte sexual; (iii) fêmeas de fengodídeos (ápteras, larviiformes) possuem uma lanterna torácica brilhante (vermelha, em *Phrixothrix* spp. e verde-amarelada, em *Phengodes* spp.) e um par de lanternas laterais verde-amareladas localizadas em cada segmento abdominal; quando andando na terra elas parecem trens iluminados correndo sobre trilhos, daí o nome "railroad worm"; os machos têm asas e, como os elaterídeos, emitem luz (verde amarelada) continuamente quando voam. As Fotos 1-3 reproduzem imagens de três representantes dessas famílias.

De acordo com Silva (1958) a primeira citação da ocorrência de bioluminescência no Brasil e, talvez, nas Américas é o manuscrito do colonizador português Gabriel Soares de Souza para Dom Crisóvão de Moura, leal servidor do rei Felipe II da Espanha, em 1587, no qual ele descreve a existencia dos "mamoás", e "buijejas", nomes indígenas para, respectivamente, lampirídeos, e fengodídeos na região da Bahia.

"... Na Bahia se criam uns bichos, a que os índios chamam mamoás , aos quais chamam em Portugal lucernas, e outros cagalumes, que andam em noites escuras, assim em Portugal como na Bahia, em cujos matos os há muito grandes; os quais entram de noite nas casas às escuras, onde parecem candeias muito claras, porque alumiam uma casa tôda, em tanto que às vêzes acorda uma pessoa de súbito vendo a casa clara, deitando-se às escuras, do que se espanta

Foto 1. Especimens representantes da família Lampyridae. O macho possui órgãos luminescentes maiores.

Foto 2. Adulto da família Elateridae. Os espécimens dessa família possuem dois fotóferos no protórax e um no abdômen.

Foto 3. Larvas da família Phengodidae. A, Luz ambiente, B,
Luz própria.

cuidando ser outra coisa; dos quais bichos há muita quantidade em lugares mal povoados.

Também se criam outros bichos na Bahia mui estranhos, a que os índios chamam buijeja, que são do tamanho de uma largata de couve, o qual é muito resplandecente, em tanto que estando de noite em qualquer casa, ou lugar fora dela, parece uma candeia acesa, e quando anda é ainda mais resplandecente. Tem este bicho uma natureza tão estranha que parece encantamento, e tomando-o na mão parece rubim, mui resplandecente, e se o fazem em pedaços, se torna logo a juntar e andar como dantes; e sôbre assinte se viu por vêzes em diferentes partes cortar-se um destes bichos com uma faca em muitos pedaços, e se tornarem logo a juntar; e depois o embrulharam em um papel durante oito dias, e cada dia o espedaçavam em migalhas, e tornava-se logo a juntar e reviver, até que enfadava, e o largavam..."

Embora o primeiro reconhecimento de que a bioluminescência se deve a uma reação envolvendo uma substância termoestável (luciferina) e outra lábil (luciferase) tenha sido feito com extratos aquosos de fotóferos de um elaterídeo (*Pyrophorus noctilucus*; Dubois, 1886), muito pouco se investigou sobre a bioquímica destes insetos. Provavelmente, a dificuldade de ter-se disponível grande quantidade de insetos para os estudos bioquímicos tenha sido a maior barreira para a pesquisa. Tem-se assumido categoricamente que não existe nada de novo quanto ao seu sistema bioluminescente, e que sua luciferina e luciferase são idênticas àsquelas dos Lampyridae.

Até o presente, a bibliografia de elaterídeos inclui; (i) artigos de sistemática (descrição e reclassificação), nas quais a principal autora, C. Costa (1968 - 82), enumera cerca de 17 gêneros bioluminescentes da tribo Pyrophophorini (veja o mapa filogenético que segue; Costa, 1975), (ii) um artigo de McCapra e Razavi (1976) onde descrevem a alimentação de *Pyrophorus pellucens* adulto com DL-¹⁴C-cistina e mostram, por via indireta, que a luciferina é sintetizada nessa fase de metamorfose do inseto, e (iii) o estudo espectral (Biggley e col., 1967) de três espécies luminescentes: *Pyrophorus phsoderus*, *Pyrophorus noctilucus* e *Pyrophorus plagiophthalmus*.

Na família Elateridae, os insetos têm os quatro estágios de metamorfose completos (Holometabola). O tempo do ciclo de vida dos Elateridae varia de espécie para espécie, sendo de, aproximadamente, dois anos (Esquema 1). No início das noites quentes e úmidas do verão os adultos revoam para o acasalamento e postura de ovos. As espécies de Elateridae são abundantes e distribuem-se por todo o território brasileiro (Costa, 1975).

Esquema 1.

Mapa filogenético da tribo Pyrophorini

Os ovos desses insetos são menores que 1 mm (o tamanho depende da espécie) e colocados aos milhares pelas fêmeas. Durante muito tempo a emissão de luz de ovos de insetos luminescentes foi controversa na literatura.

As larvas são esbranquiçadas e de tamanho variável (de 0,5 até 5,0 cm de comprimento, dependendo da espécie e idade). Vivem em geral em troncos em fase de apodrecimento, no qual escavam galerias ajustáveis perfeitamente ao seu corpo, tornando assim a sua captura muito difícil. São altamente predadoras e emitem luz esverdeada por todo o corpo, porém com mais intensidade nos dois primeiros segmentos do protórax. Além da emissão intensa nos dois primeiros segmentos, as larvas de *Pyrearinus termitilluminans* também emitem nos dois últimos segmentos abdominais. Alimentam-se, em seu ambiente, principalmente de outras larvas e quando criadas em laboratório são colocadas separadamente em pequenas caixas ou placas de vidro, pois juntas se aniquilam.

Nos campos abertos de pastagem (cerrados) do Brasil Central como também em algumas regiões Amazônicas, especialmente em noites de lua nova, pode-se admirar uma impressionante e grandiosa manifestação de bioluminescência (foto da capa): os "termiteiros fosforescentes" ou "cupinzeiros luminescentes" (Lenko e Papavero, 1979; Redford, 1982). Existe, aproximadamente, um termiteiro em cada dez metros quadrados e em cada um, centenas de pequenos "pontos" de luz verde. O conjunto ilumina todo o campo, dando a impressão de prédios (iluminados) à noite.

Surpreendentemente, somente em 1982 este fenomeno foi propriamente entendido. Redford (1982) o descreveu como resultado da luz proveniente do protórax das larvas de *Pyrearinus termitilluminans*, um elaterídeo descrito concomitantemente por Costa (1982), exposto nas bocas dos túneis escavados pelas larvas nos cupinzeiros. A emissão de luz atrai presas aladas que então seriam devoradas pelas larvas luminescentes.

Os adultos de Elateridae em geral têm dimorfismo sexual; os machos são menores e seus fotóferos, maiores e mais brilhantes. Neste estágio os insetos são fitófagos, mudando assim seus hábitos alimentares, já que as larvas, como visto, são carnívoras. Toda a taxonomia dos elaterídeos, como na maioria dos insetos, está baseada exclusivamente no estágio de adulto (Costa, 1975).

Aproveitando a larga distribuição de elaterídeos no território brasileiro e contando com a colaboração de entomologistas da Universidade de São Paulo, decidimos iniciar um amplo programa de investigação de aspectos ecológicos, biológicos e bioquímicos desta família de insetos. Assim, nesta tese de doutoramento, serão abordados os seguintes itens: (i) novas técnicas para coleta e criação laboratorial de elaterídeos, (ii) inquilinismo com cupins; (iii) propriedades físico-químicas do sistema luciferina/luciferase, (iv) biossíntese da luciferina, (v) distribuição espectral "in vivo" e "in vitro" da bioluminescência, (vi) interrelação entre o oxigênio disponível no habitat -metabolismo de oxiradicaís-/bioluminescência e

(vii) composição enzimática do regurgitado que os elaterídeos larvais injetam em suas presas para pré(extra-corpórea)-digestão. Naturalmente, com fins comparativos, alguns experimentos foram realizados com outras famílias de insetos. Porém, antes de apresentamos e discutirmos os dados experimentais obtidos, faremos uma breve introdução bibliográfica aos temas principais enfocados nessa tese: bioluminescência, espécies ativas de oxigênio e digestão em insetos.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1. Bioluminescência

A emissão de luz fria por organismos vivos - a bioluminescência - vem despertando a atenção de biólogos e químicos desde o século passado (Dubois, 1885, 1886; Atkinson, 1887). A bioluminescência é um processo oxidativo, altamente exergônico, no qual a energia química é convertida em energia luminosa (Hastings, 1966). Na maioria dos casos a transformação é realizada através da produção de intermediários peroxídicos: dioxetanos e dioxetanonas. Estes compostos são peróxidos com anel tetra-atômico, cuja clivagem térmica leva à formação de um produto no estado excitado, o qual decai para o estado fundamental emitindo luz (Esquema 2). Especula-se que alguns

ESQUEMA 2.

organismos, quando o ambiente passou de anaeróbico a aeróbico, tenham desenvolvido a bioluminescência como um mecanismo de detoxificação contra o oxigênio molecular (Seliger e McElroy, 1965). São bioluminescentes várias espécies de bactérias, dinoflagelados, fungos, celenterados, moluscos, anelídeos, crustáceos, insetos, equinodermos e peixes. Não se conhecem vegetais luminescentes, nem representantes das classes de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Herring, 1978). A Tabela 2, extraída do artigo de Roda e col., (1983), e posteriormente atualizada, mostra os principais sistemas bioluminescentes.

A bioluminescência ocorre com maior frequência entre os seres habitantes das profundezas dos oceanos, principalmente abaixo de 700 metros, onde a intensidade luminosa máxima situa-se na região do azul esverdeado (480 nm) (Cormier, 1978). Provavelmente este é o motivo de os seres marinhos terem desenvolvido sua visão com eficiência máxima nesta região espectral e o azul ter sido selecionado como a cor predominante na bioluminescência marinha. É interessante o "peixe pescador" (*Pachystomias*) que possui órgão luminescente vermelho na extremidade de uma estrutura cartilaginosa projetada à frente de sua cabeça e, como pode enxergar na região do vermelho e os demais peixes e outras presas não o podem, ele consegue caçar o "alimento" vendo-o com mais facilidade.

A emissão biológica de luz certamente tem importante significado social entre os organismos (Harvey, 1952). Demonstrou-se que serve à comunicação entre indivíduos da mesma

Tabela 2. Principais sistemas bioluminescentes.

Exemplo de Organismo	Reagentes	Emissão Máxima (nm)	Bibliografia
Bactéria: <i>Vibrio fischeri</i> e <i>harveyi</i>	Luciferina (aldeído) L'ase, FMNH, e O ₂	478-505	Hastings, 1985
Protozoário: Dinoflagelados	Luciferina (pigmento biliar) L'ase e O ₂	470	Dunlap e col., 1980
Celenterado: <i>Aequorea</i> , <i>Obelia</i> <i>Mnemiopsis</i> , <i>Renilla</i> ou celenterazina	Fotoproteína, Ca ²⁺ ou celenterazina	508, 485	Cormier e col., 1974 Shimomura e Johnson, 1966
Anelideo: <i>Diplocardia</i>	Luciferina (aldeído) L'ase e H ₂ O ₂	500	Ohtsuka e col., (1976).
Molusco: <i>Latia</i>	Luciferina, L'ase (prot. púrpura) e O ₂	535	Shimomura e Johnson, 1968
Crustáceos: <i>Cypridina</i>	Luciferina, L'ase e O ₂	465	Johnson e Shimomura, 1978
Miliápode: <i>Luminodesmus</i>	Fotoproteína, Mg ²⁺ , ATP e O ₂	496	Shimomura, 1981
Insetos: <i>Photinus</i> , <i>Photuris</i>	Luciferina, Mg ²⁺ , L'ase, ATP e O ₂	552-582	DeLuca, 1976
Hemicordata: <i>Balanoglossus</i>	Luciferina, L'ase (peroxidase) e H ₂ O ₂		Cormier e Dure, 1973
Vertebrados: <i>Porichthys</i>	Luciferina, L'ase e O ₂	459	Cormier e col., 1967

espécie (diferenciação, atração e corte sexual, formação e manutenção de bandos e cardumes, etc.), para perseguir e atrair as presas, para fugir de um predador, distraíndo-o ou mesmo camuflando-se com a luz ambiente, assustar o possível predador com emissões fortes e contínuas de luz. As funções biológicas da bioluminescência de bactérias, algas e fungos não são, entretanto, tão evidentes.

O comprimento de onda da luz varia de espécie para espécie, mostrando assim uma possível dependência da função a ser satisfeita. Por exemplo, alguns crustáceos e peixes luminescem na região do azul (460 nm), bactérias no azul esverdeado (490 nm), cogumelos no verde (530 nm), algumas espécies de "vagalume" no amarelo (560 nm) e larvas de *Phrixothrix* (Família *Phengodidae*) apresentam órgãos luminosos abdominais que emitem na região verde-amarelado e uma lanterna vermelha (620 nm) no tórax.

1.2.1.1. Bioquímica da Bioluminescência.

A partir dos trabalhos clássicos de Harvey (1952), houve significativo progresso na compreensão da bioquímica da produção de luz por organismos uni e multicelulares, marinhos e terrestres. Vários laboratórios em todo o mundo são os responsáveis por estes avanços e algumas revisões recentes detalham melhor essas informações (Herring, 1977, 1978; Hastings e Michelson, 1974; Cormier e col., 1975; Brinks e col., 1976;

Hastings e Wilson, 1976; Hastings, 1976, 1983; Anctil, 1979; Shimomura, 1983; McElroy e DeLuca, 1983).

A bioluminescência pode ser visualizada como um fenômeno biológico de adaptação estrutural (algumas espécies possuem órgãos especializados na emissão de luz, fotóforos) e química. A luz emitida por seres vivos é o resultado da desativação radiativa de moléculas-produto (P) eletronicamente excitados, no estado singlete, ou seja, fluorescente (P^{1*}), formados na oxidação de determinados substratos (denominados genericamente luciferinas) por O_2 ou H_2O_2 , em presença de enzimas específicas (denominadas genericamente luciferases) (McCapra, 1976). Trata-se assim de um fenômeno químico de conversão preferencial da energia contida nas ligações químicas do substrato em energia luminosa, com um mínimo de dissipação térmica. O esquema geral abaixo representa a reação bioluminescente.

Em geral, o espectro de bioluminescência coincide com o espectro de fluorescência do produto (ou oxiluciferina). Por efeitos de filtração por determinados pigmentos celulares, em

alguns casos, pode-se alterar a cromaticidade original da oxiluciferina, ou então, o produto excitado (P^{1*}) pode transferir sua energia eletrônica para outro componente celular (uma proteína, ou flavina, por exemplo), o qual fluoresce em seguida.

A bioluminescência e a fotobiologia podem ser vistas como fenômenos adversos: no primeiro caso, emissão de fótons decorre de reação química catalisada por uma enzima, e, no segundo caso, absorção de fótons por um fotoceptor (clorofila, fitocromo, flavinas e carotenos, por exemplo), o qual se excita e desencadeia uma série de reações fotoquímicas que culminam com respostas biológicas (fotossíntese, fototropismo, fototaxis, ritmos circadianos e sazonais, etc.). O esquema abaixo mostra a atividade biológica disparada por absorção de fótons.

*

Fotoreceptor (FR) $\longrightarrow$ FR $\longrightarrow$ fotoquímica $\longrightarrow$ respostas biológicas

McCapra (1970, 1976) e McElroy e DeLuca (1973) foram os pioneiros na elucidação dos mecanismos químicos da bioluminescência (BL), enquanto Rauhut (1969) e White e col. (1975) desenvolveram pesquisas sobre os mecanismos da quimioluminescência (QL) de vários compostos.

Uma reação bioluminescente ou quimioluminescente compreende, em geral, três etapas:

i. **Preparação**: série de reações consecutivas que levam à formação de um intermediário "rico em energia" (dioxetanos e dioxetanonas, por exemplo), precursor do provável produto excitado.

ii. **Quimiexcitação**: etapa em que o intermediário decompõe-se; a energia disponível, proveniente das ligações químicas quebradas e formadas, é canalizada para a excitação eletrônica do produto.

iii. **Emissão**: O produto, no estado singlete, cai para o estado fundamental através da emissão de fótons (fluorescência).

Para ocorrer a emissão de luz visível, o intermediário da etapa de excitação eletrônica do produto, em um processo quimi- ou bioluminescente, deve ser suficientemente "rico em energia" para fornecer 41 a 71 Kcal/mol (700-400 nm). Além disso,

os rendimentos quânticos ϕ_{QL} ou ϕ_{BL} (número de Einstein de fótons emitidos por mol de reagente consumido, $\phi_{BL} = \phi_i \phi_{ii} \phi_{iii}$), devem ser os mais altos possíveis (0,12 a 0,17 para bactérias, 0,28 para o crustáceo *Cypridina*, 0,04 para o celenterado *Renilla* e 0,88 para o vagalume) (McCapra, 1976; Seliger e McElroy, 1960).

Durante muito tempo discutiu-se a respeito dos mecanismos de clivagens moleculares na etapa de quimioexcitação (ϕ_{ii}) de sistemas quimioluminescentes clássicos (acridinas, lófinas, oxalatos, lucigenina) (Esquema 3) e dos bioluminescentes mais conhecidos (vagalumes, celenterados e crustáceos) (Hastings, 1976; McCapra, 1970; Rauhut, 1969; White e col., 1975; McCapra, 1973; DeLuca e col., 1976; Shimomura e Johnson, 1979). Alguns autores defendiam a participação de compostos dioxetânicos (peróxidos cíclicos de anel tetraatômico) como intermediários (via a do esquema 4), enquanto outros argumentavam a favor de um mecanismo via peróxidos lineares (via b) (McCapra, 1976).

Esquema 4.

Esta controvérsia parece ter sido esclarecida satisfatoriamente com os trabalhos de marcação isotópica (^{17}O , ^{14}C -luciferina, ^{14}CO e $^2\text{H}_2\text{O}$) realizados com os sistemas de vagalume (Wannlund e col., 1978) e *Cypridina* (Shimomura e Johnson, 1979), mostrando que o caminho provável é a via a.

Segundo Hastings (1983), a grande diversidade química de luciferinas (Esquema 3) e de mecanismos de reação nos sistemas bioluminescentes conhecidos leva à estimativa de que a bioluminescência pode ter surgido independentemente no curso da evolução pelo menos trinta vezes.

Esquema 3. Natureza química de algumas luciferinas e compostos quimiluminescentes.

1.2.1.2. Bioluminescência de Organismos Terrestres

Enquanto que as condições marinhas (alta pressão, baixa temperatura e escuridão) favoreceram o aparecimento de uma enorme variedade de espécies bioluminescentes, o ambiente terrestre foi menos adequado para esta seleção. É conhecido um número relativamente pequeno de espécies luminescentes na superfície da terra, entre eles, fungos, anelídeos, moluscos e insetos.

A classe Insecta, sem dúvida, é a que apresenta um maior número de espécies luminescentes, e a família Lampyridae é a mais estudada. Segundo Lloyd (1978) são conhecidas hoje cerca de 2.000 espécies de lampirídeos luminescentes, excluindo-se a grande maioria, ainda não classificadas, das espécies da América do Sul, que é provavelmente o berço geográfico desta família. Os lampirídeos estudados com maiores detalhes são espécies americanas, européias e asiáticas, pertencentes aos gêneros *Photuris*, *Photinus*, *Pyroctomeno*, *Luciola* e *Pteroptyx*. Em sua revisão, Lloyd também discute a função dos "flashes" em determinadas espécies e a variabilidade da cor da luminescência (espécies norte-americanas, na região do vermelho; espécies sul-americanas, na região do azul). Case e Strause, (1978) e Strause e Case (1981), estudando o lampirídeo *Photuris pennsylvanica* "in vivo", esclareceram que o evento primário da bioluminescência durante a metamorfose do inseto é realmente transmissão neurológica. Confirmou-se também nesses estudos que, nas várias fases do desenvolvimento da vida do inseto, aplicando-se pequenas descargas elétricas, havia o

aparecimento de luminosidade nos órgãos. Diversas especulações a respeito das funções das reações bioluminescentes foram feitas, por exemplo: adaptação evolutiva (Harvey, 1952), predação, comunicação, atração e corte sexual. É sabido hoje que a emissão dos "flashes" pelos vagalumes adultos quase sempre contém informação de natureza sexual. Através dela os indivíduos de bandos informam ao parceiro sobre seu sexo, localização no espaço e identidade (espécie a que pertence). Assim, em algumas espécies, a fêmea é estacionária (áptera) e sinaliza para o macho, atraindo-o; em outras o macho é que sinaliza, a fêmea responde com muita precisão alguns segundos depois e o macho se aproxima. Cada espécie, por sua vez, é identificada pela cor, brilho, frequência e duração do "flash", como também pela forma, tamanho e movimentação do órgão luminescente. A duração dos "flashes" varia entre pelo menos de um segundo a 5 ou 10 segundos, nas noites frias (Lloyd, 1978). A variação da intensidade de luminescência durante o "flash" já foi registrada eletronicamente para cerca de uma centena de espécies (Biggley e col., 1967; Seliger e col., 1982a, 1982b). Os machos de algumas espécies emitem rápida e sucessivamente diversos "flashes", provavelmente para aumentar as chances de serem vistos pelas fêmeas. Já as fêmeas, de cerca de 12 espécies de *Photuris*, desenvolveram a capacidade de imitar os padrões de "flashing" das fêmeas de outras espécies, atraindo seus machos e devorando-os. Outra característica interessante de comportamento, é a sincronização dos "flashes" pelos machos de

nuvens de *Pteroptyx* (Sul da Ásia), formados de milhares a milhões de indivíduos. Entre os vagalumes, a seleção sexual se faz geralmente através da competição entre machos para fecundar as fêmeas (seleção intrasexual) e da escolha criteriosa dos cortejadores pelas fêmeas (seleção intersexual).

Estudos "in vivo" da bioluminescência de lampirídeos, realizados por Seliger e McElroy (1964) e Biggley e col. (1967), mostraram que o comprimento máximo de onda para cada espécie é diferente. Os espectros de emissão de várias espécies de vagalumes da América Central e do Norte (*Photinus*, *Photuris*, *Pyractomena*) apresentam apenas um máximo na região entre 550 e 575 nm. Já a emissão do *Luciola lusitanica* tem dois máximos: 570 e 630 nm. Esses trabalhos descreveram aproximadamente 35 espécies diferentes de lampirídeos e indicam a probabilidade de existirem isoenzimas (de luciferases) diferentes para cada espécie, ou ainda, lançam a possibilidade do microambiente em que a reação bioluminescente ocorre possa ser alterada por cátions ou ânions.

Mais recentemente, Seliger e col. (1982a, 1982b) demonstraram que há perfeito recobrimento entre o espectro de emissão de lampirídeos e o espectro de sensibilidade ótica destes indivíduos. Mais ainda, sugeriram que o máximo do espectro de emissão é mais deslocado para o vermelho no caso de lampirídeos de hábitos vespertinos, enquanto que é verde em lampirídeos de hábitos noturnos, para reduzir o efeito do "background" (ambiente fótico) da vegetação (verde) na

visualização do sinal.

Em vagalumes, as evidências indicam que é o sistema nervoso que atua diretamente no órgão traqueal terminal que, por sua vez, controla a admissão de oxigênio ao órgão luminescente. Assim, vagalumes decapitados não luminescem e se o órgão luminoso for colocado em condições anaeróbicas e, em seguida, readmitindo oxigênio, não há emissão de luz. Somente haverá "flashing" se durante a fase anaeróbica, o órgão for estimulado quimicamente (adrenalina ou anfetamina).

1.2.1.3. Sistema Luciferina/Luciferase de Vagalumes

A bioquímica do sistema bioluminescente de vagalumes tem sido investigada exaustivamente e continuamente nos últimos trinta anos. A primeira luciferase cristalina (Green e McElroy, 1956) e luciferina pura (Bitler e McElroy, 1957) foram obtidas de vagalumes (*Photinus pyralis*). Para obter-se luciferina cristalina de organismos luminescentes é necessário grande quantidade de tecidos que contenham esse substrato (fotófero). Aproximadamente 10.000 fotóferos fornecem apenas algumas miligramas de luciferina, isto porque a dificuldade e a quantidade de etapas na purificação é muito grande. Em 1961, White e col. sintetizaram pela primeira vez a luciferina de vagalume. A partir daí vários trabalhos foram desenvolvidos quanto à síntese de luciferinas-modelo e sua quimiluminescência, para que fossem elucidados o mecanismo de reação e os produtos da oxidação do substrato (Wannlund e col., 1978). Várias outras

substâncias estruturalmente análogas à luciferina foram também testadas para avaliação da afinidade da enzima por substratos mais básicos (White e col., 1966) e para observação direta da emissão de luz em comprimentos de onda diferentes (White e Branchini, 1975).

A luciferase de lampirídeos (P.M. = 100.000) é um dímero de subunidades idênticas, com dois sítios de ligação para luciferina e dois para ATP. Entretanto, o substrato ativado enzimaticamente (LH-AMP) liga-se a apenas um sítio por 100.000 daltons de enzima (McElroy e DeLuca, 1978). Estudos físico-químicos mostraram que apenas uma das subunidades é ativa. Outros experimentos revelaram que há um sítio de ligação para L-AMP e dois para dehidrolucifeína livre (L) por 100.000 de peso molecular. A natureza altamente hidrofóbica do sítio de ligação de LH ² foi demonstrada através de estudos fluorimétricos, usando 2,6-TNS e 1,5-ANS como sondas. Estes pigmentos são inibidores competitivos da luciferina e dois moles deles associam-se por 100.000 daltons de enzima. Sabe-se também que a luciferase nativa contém sete grupos sulfidrila livres por mol de enzima. Segundo Alter e DeLuca (1986) estes grupos podem ser reunidos em tres classes distintas. Classe SH-III que contem tres sulfidrilas que não estão envolvidas de forma alguma com a atividade enzimática. Classe SH-II que contem dois grupos sulfidrilas que são modificados por diferentes reagentes, inibindo a atividade enzimática de 0 a 60%. As sulfidrilas da classe SH-II não são essenciais para a atividade porém devem ter importancia na estrutura e/ou estereometria. E, finalmente

Classe SH-I, que contem duas sulfidrilas que são protegidas de alguma forma pelos substratos, e estão localizadas no sítio ativo ou próximo a ele.

A luciferase (E), como já dissemos, pode ser definida como a enzima que cataliza a oxidação de luciferina (LH) em presença de ATP, O₂ e cátion divalente (Mg ou Mn), produzindo oxiluciferina e dióxido de carbono como mostram as reações abaixo:

Vemos assim que a luciferase atua num primeiro estágio como uma transferase (1), catalisando a "ativação" da luciferina a um anidrido adenílico (E-LH₂-AMP) e, em seguida, como uma oxigenase (2), catalisando a inserção de O₂ no substrato, seguida de clivagem do intermediário peroxídico com a produção de luz (Esquema 5). A luciferase de vagalume é inibida por pirofosfato, por AMP, pela oxiluciferina e pela dehidroluciferina (L), presentes no órgão luminescente.

Como visto anteriormente, existem hoje fortes evidências, obtidas através de técnicas de marcação isotópica, a

D(-) Luciferina

Oxiluciferina

Dehidroluciferina

favor de um intermediário dioxetânico neste processo. Após os trabalhos de Horn e col. (1978) e McCapra (1977) sobre a quimioluminescência de peróxidos cíclicos como modelos, iniciada por transferência de elétrons (CIEEL - "Chemically Initiated Eletron Exchange Luminescence"), tem-se proposto o mecanismo delineado no Esquema 6 para a etapa de quimiexcitação, envolvendo a clivagem da dioxetanona intermediária.

Recentemente, Wada e col. (1985) demonstraram através de medidas espectroscópicas e de cálculos teóricos por LCAO-ASMO-SCF-CI, que de fato , existe uma banda de transferência de carga do grupo benzotiazólico para o anel tiazínico.

White e col. (1966,1969,1971,1975) demonstraram que a região do espectro em que a oxiluciferina emite depende diretamente do microambiente em que a reação está ocorrendo. Se o produto excitado for gerado como monoânion I, então a luz emitida será próxima do vermelho; na forma do diânion II, a luz emitida será na região do verde-amarelado (Esquema 5).

Esquema 6. Mecanismo via transferência de elétron proposto para o sistema bioluminescente de vagalumes.

A) Koo, Smidt e Schuster, (1978).

B) McCapra, (1977).

Outros trabalhos foram também realizados com a intenção de esclarecer as diferenças nos comprimentos máximos de emissão, de espécie para espécie. Constatou-se que fatores externos como concentração hidrogeniônica (McElroy e col., 1969), força iônica, presença de íons bivalentes como Zn^{2+} , Cd^{2+} e Hg^{2+} (Seliger e McElroy, 1964), promovem o deslocamento do máximo de emissão. Com o abaixamento do pH do meio e o aumento da concentração salina há o deslocamento da curva para a região do vermelho. Enfim, quaisquer parâmetros que alterem a conformação da luciferase resultarão numa diferente partição da energia de excitação disponível entre produtos "enolato" e "lactama", daí os diferentes espectros finais de emissão. Estudos com modelos de substratos (Phenoxido-1,2-dioxolano substituído) (Schaap e Gognon, 1982), vários nucleosídeos substituídos (Moyer e Henderson, 1983), sondas para o sítio de ligação de ATP em luciferase de vagalumes (Rosendahl e col., 1982) e os efeitos de solventes na atividade catalítica de luciferase (Kricka e DeLuca, 1982), têm sido de grande utilidade para o atual desenvolvimento e esclarecimento da bioquímica da bioluminescência.

Fatores como concentração de ATP, constante dielétrica do meio e modificações estruturais na luciferina (White e col., 1966; DeLuca e col., 1979) afetam diretamente a cinética da emissão de luz, tanto em extratos brutos como em enzima purificada. Seliger e McElroy (1964) compararam as luciferases e luciferinas de várias espécies de vagalumes, fazendo o inter cruzamento de extratos de enzimas de uma espécie com a

luciferina de outra.

Vários métodos parciais e esquemas completos de purificação de luciferases têm sido descritos (Bény e Dolivo, 1976; Shimomura e col., 1977). Métodos altamente adaptáveis à purificação em pequena ou larga escala, com bons rendimentos, reusabilidade dos reagentes e materiais e muito conveniente, são os que utilizam cromatografia de afinidade (Branchini e col., 1980; Rajgopal e Vijayalakshimi, 1982).

Em 1981, Strause e DeLuca encontraram evidências da existência de isoenzimas de luciferases em fases diferentes do crescimento do inseto luminescente. Por isoeletrofocalização em coluna encontraram ponto isoelétrico (pI) para luciferase de adulto igual a 6,1 e para a fase larval pI= 4,6. Mais recentemente Wienhausen e DeLuca (1985) mostrara que várias luciferases de Lampyridae e Elateridae são antigenicamente similares e que as migrações relativas dessas enzimas em geis em condições denaturantes mostraram que a luciferase de *Pyrophorus plagiophthalmus* (Elateridae) tem peso molecular menor e que em algumas espécies de *Photuris* (Lampyridae, estágio larval) a luciferase é maior que aquela de *Photinus pyralis* adulto (Lampyridae).

A partir de 1961, vários laboratórios investiram fortemente na pesquisa dos usos práticos da bioluminescência e com isso muitos estudos desenvolveram-se quanto às aplicações analíticas da reação bioluminescente. A especificidade da luciferase da vagalumes por ATP na conversão de luciferina para

luciferil-adenilato tem sido usada para desenvolver muitos testes de dosagem de nucleotídeos em várias áreas como: monitoração de poluentes orgânicos em águas, crescimento bacteriológico, células tumorais, estudos de metabolismo energético celular, lise celular, determinação de vitamina, testes de sensibilidade antibiótica e fosforilação e transporte de elétrons em mitocôndria e cloroplastos (Roda e col, 1983).

Resumindo, nos últimos 30 anos os pesquisadores da área de bioluminescência de insetos (da família Lampyridae) tiveram sua atenção voltada para os seguintes aspectos: (i) distribuição espectral da bioluminescência "in vivo" e "in vitro" (Seliger e col., 1964; Seliger e McElroy, 1964; Biggley e col., 1967), (ii) determinação da estrutura química da luciferina (White e col., 1961, 1969; Kishi e col., 1968); (iii) isolamento e propriedades físico-químicas da luciferase (Green e McElroy, 1956; DeLuca e McElroy, 1974, 1978; McElroy e DeLuca, 1983); (iv) mecanismos químicos da emissão de luz (DeLuca e Dempsey, 1971; White e col., 1975; Shimomura e col, 1977; Wannlund e col., 1978; Bell e col., 1982), (v) imobilização da luciferase (Ugarova e col., 1982;); (vi) co-imobilização da luciferase com sistemas multienzimáticos (DeLuca, 1984); (vii) clonagem do DNA da luciferase (De Wet e col., 1985); (viii) microscopia do órgão luminescente (Ghirandella, 1978), (ix) controle fisiológico da bioluminescência (Anctil, 1979) e (x) aplicações analíticas da bioluminescência (Van Dike, 1985).

Qualquer enzima ou metabólito que participe de uma reação enzimática na qual haja formação ou degradação de ATP pode ser monitorado ou a cinética acompanhada mediante ao sistema luciferina/luciferase de vagalume. No Apêndice estão citados alguns substratos e enzimas de interesse na química clínica capazes de serem dosados com a reação bioluminescente de vagalumes. Neste apêndice, fazemos uma revisão do atual desenvolvimento das aplicações clínicas e analíticas que utilizam o sistema bioluminescente de lampirídeos e , possivelmente, também aquele dos elaterídeos.

1.2.2. Toxicidade de Oxigênio

A reação bioluminescente é aeróbica e portanto, a presença de oxigênio poderia limitar a velocidade da reação. Durante muito tempo, a bioluminescência tem sido enfocada como uma saída evolutiva, degradativa e de adaptação quando o sistema ecológico passou de anaeróbico a aeróbico. Em insetos, como em todos os organismos conhecidos, devem existir mecanismos de proteção contra oxigênio semi-reduzido, proveniente da metabolização aeróbica. Postulou-se que, em insetos luminescentes, a bioluminescência seria um destes mecanismos de detoxificação contra oxigênio.

A molécula de oxigênio está presente num estado fundamental triplete; entretanto, seus produtos de redução (H_2O e H_2O_2) apresentam-se no estado fundamental singlete. A redução direta de O_2 por dois ou quatro elétrons é, portanto, proibida pela conservação de spin. Nishinaga (1977) propõe alguns modos de se contornar esta restrição, através da "ativação" do oxigênio molecular nos seguintes processos:

i. excitação eletrônica, com inversão de spin, a oxigênio singlete (O_2^1);

ii. coordenação de O_2 em complexos metálicos;

iii. redução de O_2 em etapas de um elétron, como mostra o esquema que segue:

As formas semi-reduzidas de O_2 ocorrem em baixa concentração e são metabólitos normais em células aeróbicas. Tanto o superóxido ($O_2^{\cdot -}$) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são oxidantes nucleofílicos (Michelson e col., 1977).

Todas as espécies ativadas de oxigênio são interconvertíveis (esquema abaixo) e todas as células aeróbicas, procarióticas e eucarióticas, conseguem suportar um grau limite dessas espécies. Esse limite é controlado pela destruição, espontânea ou mediada por enzimas especializadas, das espécies ativas.

O oxigênio é essencial para a sobrevivência de organismos aeróbicos, porém em condições hiperbáricas, torna-se tóxico e deletério, pois leva à produção exacerbada de íons superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), radicais perhidroxil ($\text{HO}_2^{\cdot}$), radicais hidroxil ($\text{HO}^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As enzimas responsáveis pelo controle da concentração intracelular dessas substâncias tóxicas são a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) (Michelson e col., 1977).

Vários fatores podem estar envolvidos na produção de potentes oxidantes celulares. Por exemplo, o ferro pode catalizar as reações do tipo Haber-Weiss e Fenton (White e Repine, 1985). Através desses processos, oxidantes menos tóxicos, como o ânion superóxido e/ou peróxido de hidrogênio podem ser convertidos no

radical hidroxil que é bem mais tóxico. A influência do ferro sobre a produção dos metabólitos de oxigênio é indubitavelmente afetado pela carga iônica, ligação ou quelação (transferrina, ferritina ou apolactina) (Ambruso e Johnston, 1981, Biellmond e col., 1984 e McCord e Day, 1978). As superóxido dismutase são metaloproteínas presentes em todas as células que utilizam oxigênio no metabolismo (Fridovich, 1968, 1972, 1974 e 1975). Três classes distintas dessas enzimas são encontradas nos organismos, diferindo principalmente no metal que compõe sua estrutura. Em mitocôndrias, encontra-se uma Mn-SOD que contém quatro subunidades idênticas com 190 resíduos de aminoácidos. Em algas e bactérias, encontra-se a Fe-SOD, que têm duas subunidades iguais. Tanto a SOD com manganês como a SOD com ferro, são ditas como características de procariotos e mostram grande homologia em suas sequências de aminoácidos (Fridovich, 1982). Apesar de terem a mesma função, a Fe-SOD e a Mn-SOD têm sequências peptídicas diferentes daquela da SOD com Cu e Zn, de natureza citoplasmática (Steinman e Hill, 1973).

Tem sido demonstrado que os eucariotos geralmente contêm a Cu-Zn-SOD (32000 daltons) e a Mn-SOD (86000 daltons). A Cu-Zn-SOD é inibida por cianeto (CN^-) e estável no tratamento com etanol e clorofórmio, já a Mn-SOD é resistente a CN^- e se denatura facilmente em presença de clorofórmio e etanol. A Mn-SOD é encontrada na matriz mitocondrial e a Cu-Zn-SOD em citossol de várias células de diversos organismos (leveduras, plantas e vertebrados (Fridovich, 1982)). Uma Cu-Zn-SOD de 134.000 daltons tetramérica foi isolada recentemente de pulmão humano e tem

grande importancia como sequestrador extracelular de espécies ativadas (Marklund, 1982).

O mecanismo enzimático da Cu-Zn-SOD (eritrocupreína) foi primeiramente proposto por Fridovich (1979) como:

e, de maneira geral o mecanismo de ação de todas as superóxidos dismutases pode ser descrito como:

Em geral, organismos aeróbicos contêm SOD e anaeróbicos não. Em *Lactobacillus plantarum* (aerotolerante) ainda não foi detectado essa enzima, pois em fase estacionária (meio rico em Mn^{2+}) não respiram e na fase de crescimento, o manganês existente pode atuar, lentamente, como desproporcionador de íon superóxido (Fridovich, 1982)

A SOD é uma enzima induzível pois, ratos, leveduras e

bactérias quando expostos a excesso de oxigênio, apresentam acúmulos de SOD intracelular para a manutenção do nível de radicais de oxigênio. Em *E. coli* a Fe-SOD é sintetizada em presença ou não de oxigênio, entretanto a Mn-SOD só é sintetizada na presença de oxigênio (Hassan e Fridovich, 1981).

A catalase, presente em animais e bactérias, está localizada preferencialmente em organelas subcelulares como peroxissomas (Nicholls e Schombaum, 1963). Todas as catalases isoladas até o momento têm 4 átomos de ferro por molécula de proteína. O ferro apresenta-se na forma de 4 grupos prostéticos Fe^{3+} -protoporfirina IX, exceto nas catalases de fígado onde um ou mais grupos prostéticos estão degradados como pigmentos de bile.

É difícil identificar células de mamíferos nas quais a catalase não esteja presente e a variabilidade de quantidade existente nas diferentes células é marcante (Theorell, 1951). Em vários casos a enzima está localizada em organelas subcelulares, tais como os peroxissomas do fígado e rim, ou em vários pequenos agregados chamados de microperoxissomas, encontrados em uma enorme variedade de outras células (DeDuve e Boudhuin, 1966, DeDuve, 1973 e Novikoff e col., 1973).

As propriedades químicas da catalase proveniente de diferentes organismos e suas funções quanto ao composto enzima-substrato foram revistas por Schanbaum e Chance (1976).

A catalase exhibe caracteristicamente dois tipos de

atividade (catalásica e peroxidásica), com cinéticas completamente diferentes (Schombaum e Chance, 1976). O esquema abaixo representa a cinética da catalase em sua função catalásica (Equação i e ii) e peroxidásica (Equação i e iii).

$$k_1 = 1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k'_4 = 2,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_4 = 0,2 - 1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

A glutathiona peroxidase, cataliza a redução de hidroperóxidos orgânicos para álcool e peróxido de hidrogênio para água. GPX e CAT complementam-se mutuamente com respeito a localização intracelular (Chance e col., 1979). Embora H_2O_2 seja fonte de elétrons para a catalase, GPX é dependente de um fluxo contínuo de equivalentes redutores de um sistema adicional de enzimas e cofatores (Fantone e Ward, 1982). Essa relação está sumarizada no esquema que segue onde é mostrado o sistema da glutathiona peroxidase.

Além do controle fino da toxicidade de oxigênio exercido pela SOD, CAT e GPX, outras enzimas também são conhecidas como metabolizadoras de produtos de redução do O_2 , por exemplo, as heme-proteínas (lactoperoxidases, peroxidase de tiróide e mieloperoxidase), a citocromo oxidase, o citocromo P₄₅₀, dioxigenases e outros. Deve-se também lembrar que existem mecanismos químicos responsáveis pelo controle da toxicidade de oxigênio, como, por exemplo: caroteno, tocoferóis, ascorbato e quinonas (supressores de O_1), manitol, outros polialcóis e açúcares (sequestradores de radicais $\text{OH}^\cdot$).

1.2.3. Enzimas digestivas de elaterídeos luminescentes

A digestão é a transformação de macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos, em unidades capazes de serem absorvidas pelas células. As enzimas digestivas são as proteínas existentes nos organismos que aceleram, de maneira específica, esse processo. As proteases em geral estão armazenadas nos organismos em forma de zimógenos, já as carbohidratases e lipases necessitam de algum íon metálico ou cofatores para serem ativados.

O alimento ingerido pelos insetos, normalmente passa através do intestino anterior e sua completa digestão é realizada na parte final do intestino (Wigglesworth, 1972). Postula-se que o processo digestivo nesses organismos ocorre essencialmente em três fases: inicial, intermediária e digestão final. A digestão inicial consiste na dispersão e/ou decréscimo do peso molecular das moléculas alimentares, através da ação de hidrolases (tais como amilase e tripsina) que atacam as ligações internas dos polímeros. A digestão intermediária é a hidrólise dos polímeros de peso molecular menor, proveniente da digestão inicial, por hidrolases (exemplificada por aminopeptidases) para dímeros e/ou oligômeros, que durante a digestão final, são clivadas em monômeros, monossacarídeos e aminoácidos, por hidrolases, tais como as dissacaridases. Sabe-se muito bem que essas fases da digestão ocorrem em diferentes compartimentos do interior do tubo digestivo (é importante lembrar que o tubo digestivo dos insetos é um tubo de comprimento e grau de

complexidade variáveis conforme o grupo taxonômico e a fase de desenvolvimento do inseto): digestão inicial no espaço endoperitrófico (dentro da membrana peritrófica, membrana tubular que envolve o alimento, e que pode estar ausente em alguns insetos) e a digestão intermediária e final, respectivamente, no espaço ectoperitrófico (espaço luminal, fora da membrana peritrófica) e, na superfície das células do meio tubo digestivo (Terra e col., 1979; Santos e col., 1983). A Figura 1 esquematiza o tubo digestivo das larvas de Lepidoptera, que é bastante parecido com os da família Elateridae.

Além dos passos digestivos descritos acima, é sabido atualmente que, principalmente para predadores, há outros dois tipos distintos de processos digestivos: uma anterior ao alimento entrar em seu corpo, que é chamada de digestão pré-oral (ou extra corpórea) e digestão, a qual é realizada no papo do animal. A digestão pré-oral tem sido estudada principalmente seguindo-se as trocas macroscópicas realizadas na presa após a injeção dos fluídos digestivos. Já a digestão que acontece no papo dos animais tem sido estudada principalmente por observação da destruição macroscópica de pedaços de materiais ingeridos, no papo do predador. As revisões bibliográficas feitas por Brues (1946), Wigglesworth (1972) e Crowson (1981) trazem maiores detalhes sobre estes tipos de digestão. Nos poucos estudos com as enzimas ensaiadas nos predadores que perfazem digestão extra-corpórea ou em papo, somente hidrolases poliméricas (principalmente proteinases) foram consideradas (Wigglesworth,

Figura 1. Tipo anatômico do tubo digestivo de Lepdoptera (Larva), o qual é bastante semelhante aos das larvas de *P.termitilluminans*. C, cecos; IA, intestino anterior; IP, intestino posterior; M, tubos de Malpighi; P, papo; V, ventrículo.

1930; Dadd, 1956; Cheung e Gooding, 1970; Cheeseman e Pritchard, 1984). Desta maneira, os estudos realizados confirmam que em várias animais, a digestão inicial ocorre frequentemente fora do predador, ou em seu papo. E nesses estudos, vários aspectos sobre a digestão inicial de predadores foram elucidados, tais como; controle da secreção enzimática e origem das enzimas do papo. Porém, as informações existentes são sobre a digestão inicial e há escassez sobre a intermediária e a final.

A digestão pré-oral ocorre em larvas de Elateridae, as quais são extremamente agressivas e predadoras. Detalhes sobre os aspectos enzimológicos e a organização espacial da digestão desses insetos eram desconhecidos e constituem um dos objetivos desta tese. Com os insetos da família Elateridae (*Pyrophorus divergens*, *Pyrearinus candelarius* e *Pyrearinus termitilluminaans*), que mantemos atualmente em criação em cativeiro no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, observamos que ao atacar o alimento (em geral são larvas vivas de Tenebrionidae e muitas vezes são maiores que os próprios Elateridae), emitem luz esverdeada intensa e contínua (como se fosse um mecanismo de distração), lançam-se sobre a presa e injetam nela um regurgitado de coloração escura. Após esse ataque, o predador se afasta (a presa fica aos poucos imobilizada), e retorna algum tempo depois para alimentar-se do material pré-liquefeito, penetrando inclusive, no interior da capa de quitina da presa. Esse material ingerido pelas larvas deve sofrer a digestão final na superfície das células ventriculares por enzimas associadas ao glicocálix ou por

enzimas integrantes às membranas plasmáticas.

Naturalmente despertou-nos o interesse em saber a constituição desse líquido regurgitado que era poderoso de tal forma que para imobilizar totalmente a presa demorava apenas alguns minutos. Para outra família, a Phengodidae, que também têm larvas de hábitos predatórios, a imobilização da presa, após a ingestão do regurgitado, é instantânea.

2. Objetivos da Tese.

Nesta tese serão descritas observações de campo e de laboratório sobre a bioluminescência de elaterídeos e abordados vários aspectos bioquímicos dentro das áreas gerais de bioluminescência propriamente dita, metabolismo de oxigênio e digestão.

I. Observações gerais de laboratório e de campo:

1. Coleta e criação dos insetos.
2. Observações visuais. Funções da bioluminescência.
3. Os cupinzeiros luminescentes.

II. Bioluminescência:

1. A luciferina de elaterídeos, independentemente da fase da metamorfose e da origem (abdominal e torácica) da lanterna, é similar àquela de lampirídeos, já que ambos são coleopteros? Dipteras luminescentes têm luciferina quimicamente diferente? Qual o efeito da dose e do tempo ao se incorporar precursor marcado (cistina) no rendimento radioquímico de luciferina?

2. Quão espécie-específica é a distribuição espectral da bioluminescência em ovos, larvas, pupas e adultos de elaterídeos? Podem os espectros auxiliar a identificação das espécies? Qual o efeito da temperatura ambiente na intensidade da emissão de luz?

3. As diferentes cores da luz emitida por lanternas abdominais e torácicas de elaterídeos adultos bem como das diferentes etapas metamórficas destes insetos resultam de diferentes condições de microambiente da reação bioluminescente, filtração interna ou ocorrência de isozimas de luciferases?

III. Metabolismo de Oxigênio:

1. A pergunta fundamental que procuramos responder neste capítulo da tese é se existe uma conexão clara entre bioluminescência e produção de espécies ativadas de oxigênio molecular. Para tanto vamos comparar os níveis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) em larvas de elaterídeos luminescentes e não luminescentes, bem como suas atividades nos segmentos luminosos e não-luminosos de larvas de *Pyrearinus termitilluminans*.

2. Como se comportam os níveis de superóxido dismutase e de catalase em diferentes famílias de insetos luminescentes e não-luminescentes?

3. Tal como proposto para lampirídeos, o sistema H_2O_2 /catalase tem papel na formação de oxigênio molecular para sustentar a reação bioluminescente?

4. Qual a relação entre a disponibilidade de oxigênio molecular no habitat e a geração de oxiradicais? As enzimas antioxidantes serão comparadas em larvas de *Pyrophorus divergens* e de um Pyrophorini não identificado, ambos

habitantes do interior de troncos em fase de apodrecimento, onde a tensão de oxigênio é inferior a 2%, e com larvas de *Pyrearinus termitilluminans*, habitante de cupinzeiros em galerias normalmente aeradas (pressão de 0,21%).

2

IV. Digestão:

1. Qual a composição enzimática do regurgitado escuro que larvas (predadoras) de *P.divergens*, *P.termitilluminans* e a espécie não identificada de Elateridae injetam em suas presas para imobilizá-las e, posteriormente, digeri-las?

2. Que atividades enzimáticas estão presentes no lúmen do tubo digestivo e quais estão ligadas à parede intestinal?

3. Quão similares (ou diferentes) são as enzimas digestivas de espécies distintas que vivem em diferentes habitats? Os parâmetros físico-químicos das enzimas poderiam ser úteis na análise filogenética destas espécies?

4. Considerando que larvas de espécies de troncos em apodrecimento escavam galerias perfeitamente ajustáveis ao corpo, teriam elas atividade celulásica presente no trato intestinal?

3. Materiais e Métodos.

3.1. Símbolos e Abreviações

BL	- Bioluminescência
LH	- Luciferina
² LO	- Oxiluciferina
L'ase	- Luciferase
HRP	- Peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase")
PPO	- 2,5-Difeniloxazol
POPOP	- p-Bis 2-(5-feniloxazoil) -Benzeno
INT	- p-iodonitrotetrazolium
BAPA	- α-N-Benzoil-D-L-arginina-nitroanilida
LpNA	- L-Leucina-p-nitroanilida
α-Gli	- p-N-φ-α-glicosídeo
β-Gli	- p-N-φ-β-glicosídeo
CMC	- Carboximetil Celulose
¹⁴ C-Cys	- L- ¹⁴ C-Cistina
Tris	- Tris(hidroximetilaminometano)
XO	- Xantina Oxidase
CCD	- Cromatografia de Camada Delgada
PMB	- p-mercuribenzoato
TNS	- 2,6 Toluidino naftaleno sulfonato
ANS	- 1,5 Anilinonaftalenosulfonato
SOD	- Superóxido dismutase
CAT	- Catalase
GPX	- Glutathiona Peroxidase

3.2. Enzimas e Reagentes

Os reagentes e as enzimas listados abaixo foram usados tal como adquiridos dos fornecedores.

ATP	- Sigma
HCl	- Carlo Erba
P O 2 5	- Fisher Scientific Company
NaH PO 2 4	- Baker Analysed
Na HPO 2 4	- Fluka
EDTA	- Reagen
MgSO 4	- Baker Analysed
NaCl	- QEEL Ind. Quim.
H PO 85% 3 4	- Carlo Erba
ZnCl 2	- Baker e Adanson
KI	- Merck
KCl	- Carlo Erba
KCN	- Merck
CaCl 2	- Merck
N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina	- Sigma
Persulfato de Sodio	- Sigma
SDS	- Sigma
Luciferina	- Sigma
Tris	- Riedel
α -Glicosídeo	- Sigma
β -Glicosídeo	- Sigma
BAPA	- Sigma
LpNA	- Sigma

CMC	- Sigma
Trealose	- Sigma
Coomassie Brilliant Blue-G	- Sigma
Ampholites	- Pharmacia Fine Chemicals
N,N'-metilendiacrilaamida	- Merck
Acrilaamida	- Merck
Maltose	- Merck
PPO	- New England Nuclear
POPOP	- New England Nuclear
Riboflavina	- Sigma
Amido	- KI-KION
Ac. 3,5-dinitrossalicílico	- Sigma
Tartarato duplo de K e Na	- Merck
Glicerol 14	- Baker Analysed
C-Cys	- New England Nuclear
Cistina e Cisteina	- Sigma
Benzilamina	- Sigma
Luminol	- Sigma
H O 2 2	- Carlo Erba
Ac. bórico	- Merck
Ac. acético	- Merck
Hipoxantina	- Sigma
Ac. succínico	- Merck
Triton X-100	- Sigma
INT	- Sigma
Fenanzina metassulfato	- Sigma
NaOH	- J.T. Baker Chemical CO

Ac. cítrico	- Backer Analysed
Carbonato de sódio	- Futaba
Bicarbonato de sódio	- Ecibra
Celobiose	- J.T. Baker Chemical CO
Acetona	- Merck
Acetato de Etila	- Carlo Erba
Etanol Absoluto	- Merck
Butanol	- Merck
Tolueno	- Merck
Metanol	- Merck
Luciferase (Lampyridae)	- Sigma
Catalase	- Sigma
Hemoglobina bovina	- Sigma
Ovoalbumina	- Sigma
Soroalbumina bovina	- Sigma
HRP tipo-VI	- Sigma
Catalase	- Sigma
Xantina Oxidase	- Sigma

3.3. Aparelhagem

Os espectros de bioluminescência "in vivo" e "in vitro" foram obtidos num fluorímetro da marca Hitachi-Perkin Elmer, modelos MPF-4 e LS-5.

As medidas de emissão de luz foram feitas em (i) fotômetro tipo Mitchell-Hastings (1971), construído em nosso laboratório, acoplado a um amplificador de corrente que permite medidas

da ordem de nanoampéres (medidas de atividade de catalase), (ii) "photon counter" marca Hamamatsu, modelo C-767, dotado de uma sequencia de 25 filtros que permite medidas de espectros de emissão muito fraca na faixa de 400-670 nm (medidas de atividade de SOD e L'ase, energia aparente de ativação e bioluminescência de ovos de *P.termitilluminans*).

Para o fracionamento de géis foi usado o aparelho Auto-gel divider-Savant Instruments-USA. Os tecidos do tubo digestivo do inseto foram homogeneizados em um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen.

As medidas de absorbância ou foram feitas em espectrofotômetros Zeiss (modelo DMR-10) ou no da Metrohm Herison (modelo E-1009).

Para as medidas de baixa intensidade de radiatividade foi utilizado um "Liquid Scintillation Counter Beckman" modelo LS-7000.

3.4. Insetos.

Os insetos adultos das espécies de Elateridae luminescentes que relacionados abaixo foram coletados durante o verão nas seguintes localidades: Estado de São Paulo; Atibaia, Capão Bonito (Sítio Cambará), Salesópolis (Estação Biológica de Boracéia), São Paulo (Represa Guarapiranga), Peruíbe. Estado de Goiás; Mineiros (Fazenda Santo Antônio), Parque Nacional das Emas.

Pyrophorinae, Pyrophorini: *Pyrophorus divergens*, Eschscholtz, 1929; *Pyrophorus punctatissimus*, Blanchard, 1843; *Pyrophorus* sp.; *Pyrearinus candelarius*, Germar, 1841; *Pyrearinus candens*, Germar, 1841; *Pyrearinus micatus*, Costa, 1978; *Pyrearinus janus*, Herbst, 1806; *Pyrearinus lineatus*, Candèze, 1863; *Pyrearinus termitilluminaans*, Costa, 1984; *Opselater pyrophanus*, Illiger, 1807; *Pyroptesis maculicollis*, Candèze, 1863.

Hapsodrilini: *Hapsodrilus ignifer*, Germar, 1841; *Hapsodrilus pyrotis*, Germar, 1841; *Hapsodrilus* sp.

Os espécimens larvais de Elateridae não-luminescentes (Pyrophorini, Pyrophorinae): *Chalcolepidus zonatus*, Eschscholtz, 1829 e *Conoderus malleatus*, Germar, 1824 , *Platycrepidius bicinctus*, Cadèze, 1859; *Conoderus* sp. e *Ischiodontus* sp.) tanto quanto as larvas de outros Coleoptera (*Ptilodactylidae*, *Ptilodactyla* sp.) e Tenebrionidae, (*Palembus dermestoides*) e as

larvas luminescentes de Lampyridae (*Bicellonycha* sp.) foram coletados nas cidades de Araras, Peruíbe e Pirassununga (Estado de São Paulo).

As larvas e as pupas correspondentes aos adultos listados acima foram obtidos de troncos de árvores em fase de decomposição ou criados a partir de ovos nos laboratórios do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. As larvas e as pupas de *P.termitilluminans* foram coletadas em "cupinzeiros luminescentes" localizados em campos abertos ou de pastagens, no Parque Nacional das Emas e na Fazenda Santo Antônio. Todos os insetos foram identificados pela Profa. Dra. Cleide Costa do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Com exceção de *P.termitilluminans*, os demais animais em fase larval usados nesta tese para estudo da digestão e toxicidade de oxigênio foram obtidos de ovos coletados de uma caixa plástica que continha adultos de *P.divergens*, *P.candelarius*, *P.candens* e *H.ignifer*. Somente dois grupos homogêneos de larvas foram obtidos da eclosão dos ovos e criação laboratorial. Larvas de *P.divergens* foram identificadas baseadas nos critérios morfológicos descritos por Costa (1975) enquanto que para o outro grupo presente não foi possível a identificação, o qual pode pertencer às espécies *P.candelarius*, *P.candens* ou *H.ignifer*. Este grupo será, portanto, chamado nesta tese, para os estudos de metabolismo de oxigênio e digestão, de "espécie não identificada de Elateridae". O que se deve deixar claro é que essa espécie e

P.divergens habitam troncos em fase de apodrecimento, onde escavam galerias ajustáveis perfeitamente ao seu corpo e a tensão de oxigênio é inferior a 2%, e *P.termitilluminans* vive em galerias aeradas de cupinzeiros.

3.5. Criação de insetos

Após a coleta de verão de insetos adultos, os ovos eram recolhidos das fêmeas e de todos os espécimes (machos e fêmeas) obtinha-se os espectros de bioluminescência "in vivo" (como descrito no item 3.7). A seguir os insetos eram, por vezes, mortos em gelo seco ou nitrogênio líquido e secados sob pressão reduzida em presença de pentóxido de fósforo. Desses animais secos ou retirava-se os órgãos luminescentes ou congelava-se o inseto inteiro para posterior utilização. As amostras foram armazenadas a -20°C com boa retenção da atividade enzimática por até 3 anos.

As larvas eclodidas de ovos e as coletadas foram criadas em laboratórios do MZUSP até o estágio de adulto fornecendo-se a elas mariscos, outras larvas de Coleopteras (Tenebrionidae), larvas criadas em resíduos de arroz e de outros grãos, rações comerciais para gato e finalmente ração de coelho, como alimento.

3.6. Moldagem das galerias dos cupinzeiros.

Com o intuito de melhor entender a relação existente entre os cupins e alguns de seus inquilinos, moldamos as galerias nas quais sabíamos existir larvas de *P. termitilluminans*. Para isto, em uma noite fomos ao campo de cupinzeiro e escolhemos um no qual havia grande número de pontos esverdeados. Marcamos a boca dessas galerias com mercurio cromo e no dia seguinte munidos de seringas de 100, 200 e 500 ml e um "kit" para polimerização com resina demos início ao trabalho. Preparamos uma mistura de polímero de resina (Resina T-208, Resana S/A Indústrias Químicas), adicionando o monômero estireno e um peróxido orgânico (Peroxol G-10), como catalisador da iniciação da polimerização, na proporção de 50:48:2. Essa solução foi injetada nos buracos marcados, esperou-se o término da polimerização, cortou-se com um serrote e a parte moldada foi transportada para o laboratório em São Paulo.

No laboratório o cupinzeiro tratado com polímero foi colocado em uma solução de NaOH 5% para a dissolução da estrutura de terra. Após aproximadamente 15 dias de lavagens exaustivas, conseguimos obter os moldes de algumas galerias.

3.7. Estudo espectral "in vivo".

Adultos, pupas e ovos de Elateridae luminescente foram colocados dentro de celas de quartzo e estimuladas batendo-se com uma espátula na cela e o espectro de emissão foi registrado várias vezes (velocidade de registro; 120 nm/min.). A janela de

emissão do fluorímetro foi fixada de 0,25 a 2,0 nm, dependendo, naturalmente, do tamanho do órgão luminescente e da intensidade de emissão. Para o caso de alguns elaterídeos (*P.divergens*, *P.punctatissimus*, *P.candens* e *H.ignifer*), a emissão ventral pôde também ser registrada colocando-se o inseto de cabeça para baixo dentro da cela de quartzo com o órgão luminescente posicionado de tal forma que permanecesse de frente à fotomultiplicadora; nesta posição estes insetos expõem seu órgão luminescente ventral. As larvas, que são muito mais ágeis, foram imobilizadas colocando-as em tubos de diâmetro selecionado, para que o animal pudesse mover-se o menos possível e o espectro registrado do mesmo modo que para adultos. Todos os dados espectrais são médias de pelo menos cinco determinações independentes e de pelo menos dois indivíduos de pelo menos duas famílias de uma dada espécie.

3.8. Cromatografia em camada delgada da luciferina.

Os extratos brutos para identificação da luciferina foram preparados de ca 10 indivíduos de uma dada espécie, seguindo-se os procedimentos de Kishi e col.(1968) descrito para *Luciola cruciata*: o extrato aquoso, gelado, de órgãos luminescentes de adultos, larvas ou pupas, pulverizados, foi tratado com acetona, acidificado em seguida com ácido hidrocloreídrico e extraído com acetato de etila. Aproximadamente 100 ovos fertilizados de *P.termitilluminans* foram usados para preparar os extratos correspondentes, com luciferina

suficiente para detectar-se por essa técnica. Alíquotas de extrato foram aplicadas em placas apropriadas para cromatografia de camada delgada (10 x 10 cm; sílica gel-60 ou celulose). Os sistemas de solventes utilizados foram: A; acetato de etila / álcool etílico / água (5:2:3), B; acetato de etila / álcool butílico / álcool etílico / água (3:2:2:3), e C; acetato de etila / álcool etílico / acetona (8:1:1). As manchas fluorescentes azul-esverdeadas foram reveladas por irradiação com uma lâmpada "Mineral Light UV.22" e comparados os seus valores de migração relativa com o encontrado para a luciferina autêntica, a qual é analisada em paralelo em todos os experimentos. O solvente leva aproximadamente 4 horas para percorrer ascendentemente as placas à temperatura ambiente.

3.9. Ensaios "in vitro" da Luciferase.

Os extratos brutos de luciferase de várias espécies de Elateridae foram preparados como segue: Retiram-se as lanternas luminescentes (protórax e abdomen) de *ca* 10 elaterídeos adultos e pulveriza-se-os em um almofariz, extraíndo-os em seguida com 7 - 10 ml de tampão tris-HCl 0,10 M pH 7,8 gelado e centrifugação a 10.000 g por cinco minutos. Alíquotas (*ca* 0,10 ml) do sobrenadante foram imediatamente ensaiadas para a emissão de luz (janela de emissão = 2 nm) no mesmo tampão contendo EDTA, 1 mM; MgSO₄, 4 mM; ATP, 2 mM e luciferina sintética de Lampyridae, 1,0 mM (mistura padrão), a 22 ± 2 °C. Estas condições experimentais não permitem que a emissão de luz decaia muito rapidamente após a emissão inicial,

o que corresponde a alguns segundos (5-10 sec., para Lampyridae ; DeLuca e col., 1979). A Figura 2 representa uma curva de emissão nas condições-padrão, sendo que após 30 segundos não há um decaimento considerável de luz. Cada espectro ou pico de comprimento de luz reportado aqui representa a média de pelo menos quatro experimentos independentes. Em alguns casos (veja em Resultados) a luciferase inativada por calor foi acrescentada na mistura de reação padrão contendo extrato de luciferase ativa, antes registrando o espectro; o objetivo é checar a possível interferência de filtros biológicos que pudessem cortar ou modular a bioluminescência. Os espectros de emissão de luz de ovos ($n = 200$) e larvas ($n = 10$) de *P.termitilluminans* foram obtidos com extratos brutos preparados como indicado acima.

Figura 2. Curva de emissão de luz de extratos brutos de protórax de *P.divergens*, nas condições descritas no item 3.9.

3.10. Energia de ativação da reação bioluminescente.

A energia de ativação da bioluminescência de ovos de *P.termitilluminans* foi determinada pela projeção do logarítmo da intensidade total de luz emitida ("photon counter") por ca 50 ovos contidos num frasco a uma dada temperatura vs o recíproco da temperatura (quatro experimentos independentes). Para o caso da intensidade das larvas, os dados foram mais dispersos, então somente uma estimativa da energia de ativação é dada. Os estudos com a energia de ativação com o extrato bruto de 200 ovos de *P.termitilluminans* com a luciferase pura de vagalumes foram realizados da mesma maneira usando a mistura padrão de reação: luciferina sintética, 1,25 mM; ATP, 2 mM e $MgSO_4$, 0,10 mM em tampão tris-HCl 0,10 M, pH 7,8.

3.11. Biossíntese de Luciferina.

3.11.1. Aplicação do precursor.

Foram utilizadas larvas de *P.termitilluminans*, nas quais foram injetados, volumes diferentes de cistina marcada com carbono 14, com uma microseringa de cinco microlitros. Estas larvas foram divididas em grupos de quatro ou cinco, onde variou-se o volume injetado de cistina e o tempo de incorporação desta substância pela larva, como indica a Tabela 3.

Depois de passado o tempo previsto, as larvas foram colocadas em gelo seco e após alguns minutos, sofreram cortes

Tabela 3. Aplicação de Cistina marcada em larvas de
⁺
Pyrearinus termitilluminaans .

Grupo	* l de Cys / larva	Radiatividade aplicada (nCi/anim.)	Incubação (horas)	Rendimento radioativo (%)
1	2	40	4	1.4
2	2	40	11	2.1
3	2	40	17	2.5
4	2	40	24	3.2
5	1	20	28	3.5
6	2	40	48	3.5
7	3	60	48	6.0
8	2	40	72	3.8

+

A injeção feita com uma microseringa de 5 µl no abdômen do inseto. As larvas preparadas (n = 5 a 10 animais para cada experimento) foram mortas e cortadas transversalmente. Os extratos brutos dos fotóferos foram solubilizados (item 2.8) e aplicados nas placas de sílica-gel e fez-se a cromatografia de camada delgada da luciferina, a qual foi revelado com a incisão de raios ultravioletas. Os rendimentos foram calculados em relação a contagem de 1 µl de Cistina radioativa.

transversais em três regiões; (i) tórax, (ii) os oito primeiros segmentos abdominais e (iii) os dois últimos segmentos abdominais, como indica a figura que segue. Lembramos que os segmentos mais brilhantes são o protórax e os últimos segmentos abdominais.

3.11.2. Preparação das amostras

As amostras foram preparadas extraíndo-se as luciferinas do extrato bruto até 6,0 ml, por alíquotas de 1,0 ml de água gelada. As extrações foram acompanhadas por incidência de raios UV no extrato e a partir de 5,0 ml (para até aproximadamente 5 animais) a luciferina parecia estar totalmente solubilizada.

Alíquotas de 0,2 ml de cada amostra foram aplicadas em placas de sílica-gel e submetidas a cromatografias ascendentes à temperatura ambiente utilizando-se a mistura de solventes B (ítem 3.8).

3.11.3. Revelação das amostras após CCD.

(i) ultravioleta

Depois de seca a placa, ela foi irradiada com raios ultravioleta, utilizando-se a lâmpada "Mineral Light UV.22" e mediu-se as migrações relativas das manchas fluorescentes, comparando-as com a luciferina sintética que percorreu a placa.

(ii) raios-X

Juntamente com as placas após cromatografia, colocou-se num cassete apropriado, um filme sensível a radiações (Sakura de Raio X) por vinte dias à temperatura ambiente em local escuro. Após este período, o filme foi revelado e fotografado e a partir da sensibilização do filme mediu-se as migrações relativas.

(iii) cintilação

Depois de percorrido o solvente pela placa, esta foi dividida em partes iguais (em média 25 frações), e as frações, raspadas com uma lâmina e pulverizadas. O pó foi colocado em frascos de vidro contendo 3,0 ml de líquido para cintilação: 10% de POPOP, 40% DE PPO em tolueno. Brancos de sílica-gel, sílica-gel+luciferina sintética, sílica-gel+cistina e sílica-gel+cisteína não mostraram qualquer cintilação.

3.12. Purificação do Luminol

Utilizamos o método de recristalização e medidas de absorvância sugerido por Drew e Permam (1937). Uma solução concentrada de luminol em 5% de NaOH resfriada a 0 °C, em banho de gelo, fornece cristais os quais foram redissolvidos em água e reprecipitados com a adição de ácido acético 10%. Seguiu-se a pureza do luminol pelo espectro ultravioleta em tetrahydrofurano (ϵ em 360 nm = $7,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.13. Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

Dosamos peróxido de hidrogênio seguindo o método de Cotton e Dunford (1973), que se baseia na oxidação de iodeto por H_2O_2 , utilizando como catalizador a HRP. Trata-se de um método espectrofotométrico onde a cela de quartzo contém 0,2 ml da solução com H_2O_2 e 1,8 ml de solução de iodeto de potássio 0,05M, HRP 5 nM em tampão acetato 0,1M, pH 3,8. A reação é iniciada pela adição de KI e mede-se então a absorvância do íon I_3^- formado, a 353 nm ($\epsilon_{\text{I}_3^-} = 2,55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.14. Padronização da Catalase

A atividade específica da catalase comercial foi determinada por meio de medidas da velocidade de desaparecimento de peróxido de hidrogênio, observando-se espectrofotometricamente o decréscimo da absorbância a 240 nm, à temperatura de 25 °C.

Esta reação é de primeira ordem, e a concentração de peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à concentração da enzima. Esta metodologia é empregada pela Sigma para a dosagem e padronização de atividade da catalase.

3.15. Determinação da curva de calibração de soroalbumina e ovoalbumina

3.15.1. Absorbância a 280 nm.

Preparamos curvas de calibração de soroalbumina bovina para relacionar e expressar a atividade de SOD e catalase por quantidade de proteína total solúvel. Foram preparadas soluções de concentrações diferentes e medidas as absorvâncias correspondentes a 280 nm.

3.15.2. Biureto.

Com o objetivo de compararmos e relacionarmos as medidas de atividade de SOD e catalase, efetuamos as determinações de proteínas nos extratos brutos, pelo método de Biureto. Neste caso a comparação das medidas é bastante importante pois, sabe-se que o ensaio de biureto é específico para ligações peptídicas, enquanto por medidas de absorbância a 280 nm, além de proteínas e peptídeos, poderíamos estar incluindo também a absorbância de substâncias, como aminoácidos livres dissolvidos na hemolinfa (fenilalanina, tirosina e triptofano) e alguma absorbância final de nucleotídeos livres (260 nm).

A curva padrão foi obtida variando-se as concentrações de soroalbumina, adicionando-se reagente de biureto e incubou-se por 15 min. a 37^o C. As leituras de absorbância foram feitas a 540 nm.

A Figura 3 ilustra curvas de calibração de soroalbumina obtidas pelo método de Biureto e a leitura simples de absorbância a 280 nm.

3.15.3. Metodo do "Coomassie-Blue"

Para a curva de calibração da concentração, a proteína utilizada foi a albumina de ovo. Seguiu-se a metodologia descrita por Bradford (1976). Dissolveu-se 10 mg do reagente colorido "Coomassie-Blue" em 5,0 ml de metanol. Após a dissolução completa, adiciona-se lentamente (gota a gota) 10 ml de ácido

Figura 3. Curva padrão da dosagem de proteínas pelos métodos de absorvância em 280 nm (-●-) e de Biureto (-○-). A proteína padrão utilizada foi a soroalbumina bovina.

fosfórico 85%. A agitação deve ser constante. Em seguida completa-se o volume da solução para 100 ml com água bidestilada. A 1,0 ml deste reagente, adicionou-se 0,1 ml da solução proteica ou de amostra. As absorbâncias devem ser medidas a 595 nm após 5 minutos de incubação. A linearidade da curva espectrofotométrica é bastante boa entre 0,5 - 50 µg de proteínas. A concentração proteica do regurgitado dos insetos e de seu tubo digestivo foi obtida através deste método. Também foi utilizada essa metodologia para a determinação de proteínas nos tecidos dos insetos na determinação de succinato desidrogenase.

3.16. Extratos brutos para medidas de atividade de SOD e catalase

O extrato bruto de cada larva foi preparado triturando-se o animal congelado, em um almofariz. Solubilizou-se o extrato em tampão fosfato 0,10 M pH 7,8 e filtrou-se sob pressão reduzida e dele ensaiou-se a SOD (Hodgson e Fridovich, 1973) e catalase (Maral e col., 1977).

Em outra bateria de experimentos, oito larvas de *P.termitilluminans* foram congeladas ou em gelo seco ou nitrogênio líquido e dissecados em quatro partes: (a) protórax, (b) meso e metatórax, (c) 1º a 8º segmento abdominal e (d) último segmento abdominal (o qual inclui o 9º e o 10º segmentos). SOD e catalase foram medidas no extrato bruto preparado para cada uma dessas partes (total 32 amostras). Para comparação, essas enzimas foram também ensaiadas nos extratos de

tórax e abdomen obtidos de três larvas de *C. zonatus*, um Pyrophorinae não luminescente.

3.17. Dosagem da catalase via inibição da reação quimiluminescente do luminol

A metodologia empregada para a dosagem de catalase é a descrita por Maral e col. (1977). Adaptamos o método para dosagem em larvas de insetos. O método é baseado em medidas de intensidade de emissão proveniente da reação quimiluminescente entre o luminol e peróxido de hidrogênio. Ao sistema de incubação, adiciona-se catalase ou o extrato a ser medido.

Em 3 ml de tampão fosfato 0,1 M contendo EDTA 10^{-4} M e $10 \mu g$ de HRP, adiciona-se 1 ml da mistura de incubação (3 ml de H_2O_2 $2,1 \times 10^{-5}$ M em tampão fosfato 0,01 M pH 7,8 e catalase, a incubação é feita a 25 C por 20 minutos). Em seguida, é dosada a H_2O_2 residual pela fluorescência do luminol oxidado.

A curva de calibração de catalase (Figura 4) mostra linearidade entre o logaritmo da intensidade de luz emitida pelo luminol e a concentração de H_2O_2 , dependente da concentração de catalase ou extrato adicionado. A reação foi iniciada por injeção

Figura 4. Curva de calibração para as dosagens de atividade de Catalase. A mistura de reação corresponde à adição de luminol (10^{-4} M), HRP ($10 \mu\text{g}$), H_2O_2 (0,21 mM) à amostra dissolvida em tampão fosfato 0,1 M pH 7,8 a 25°C .

rápida da mistura de incubação num frasco localizado no interior do fotômetro e exposto à fotomultiplicadora. A reação é extremamente rápida e a injeção não produz uma total homogeneização no sistema, impedindo que a dosagem seja somente baseada em medidas diretas de intensidade máxima. Torna-se assim necessário o uso de medidas de emissão total. Wilson (1976) já havia discutido anteriormente este inconveniente no uso de medidas baseadas na reação quimiluminescente do luminol. Para as medidas totais de luz integrou-se as áreas sob as curvas de emissão.

Constatamos a não interferência de quaisquer substância não proteica na linearidade da resposta, utilizando diferentes concentrações de extrato bruto no sistema completo (Figura 4, $\log \text{Area} \times \mu\text{l extrato bruto}$). Como controle, testamos extratos brutos, os quais foram fervidos durante algum tempo.

Todas as medidas foram feitas em duplicata, tendo-se constatado uma reprodutibilidade dentro de 15%.

3.18. Determinação da atividade de superóxido dismutase via inibição da reação quimiluminescente do luminol

A atividade de SOD foi medida por um método indireto usando a inibição da reação quimiluminescente do sistema: $\text{O}_2^- / \text{hipoxantina} / \text{xantina oxidase} / \text{luminol}$. A superóxido dismutase compete com o luminol pelo O_2^- gerado no sistema hipoxantina /

xantina oxidase (X.O.), diminuindo a emissão de luz (Hodgson e Fridovich, 1973).

Reações Envolvidas:

O tubo de reação (2 ml) continha luminol 10^{-4} M ; EDTA 10^{-4} M e xantina oxidase 0,53 U/ml em tampão fosfato 0,1 M pH 7,8. Para iniciar a reação adicionou-se 1 ml de solução de hipoxantina 3×10^{-4} M no mesmo tampão. O tubo deve estar colocado em frente à fotomultiplicadora do "photon counter" e termostaticado a 25° C pois a reação é muito rápida.

O decréscimo da emissão de luz é função da quantidade de superóxido dismutase adicionada.

A Figura 5 mostra a linearidade da resposta em função da concentração do extrato bruto. Juntamente, há uma curva (% inibição x μ l de SOD) que mostra que, até 40% de inibição, o sistema segue linearidade.

As medidas de atividade para cada inseto foram repetidas 6 vezes com quantidades diferentes de concentração de extrato bruto. O controle foi medido após fervura do extrato durante duas horas. Não se observou inibição na quimiluminescência, ou seja, a atividade enzimática medida era totalmente devida à SOD.

3.19. Ensaio de Succinato Desidrogenase

Medimos a atividade específica de succinato desidrogenase (enzima marcadora de mitocôndrias) com o intuito de avaliar se a atividade de SOD encontrada tinha alguma relação com a manutenção do metabolismo respiratório do animal.

Figura 3. Curva de calibração para as dosagens de atividade de SOD em extratos brutos de larvas. A mistura de reação corresponde à adição de xantina (0,2 mM), xantina oxidase (0,53 U/ml) e luminol (10^{-4} M) à amostra em tampão fosfato 0,1 M a 25 °C. A curva inserida representa a porcentagem de inibição da emissão do luminol com a adição de extratos brutos e mostra linearidade na resposta até 50% de inibição.

P.termitilluminans, *C.zonatus* e *P.divergens*

(cinco animais de cada espécie) foram seccionados em quatro partes; protórax, meso e metatórax, 1^o a 8^o segmento abdominal e 9^o a 10^o segmento a abdominal. Cada parte foi homogeneizada em tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e ensaiadas espectrofotométricamente (500 nm). Alíquotas de 0,1 ml das amostras foram incubadas com a mistura; ácido succínico 27 mM/KCN 0,1 M e triton X-100 2% por 10 minutos a 30^o C. A seguir adiciona-se 0,2 ml da solução de p-iodo nitrotetrazolium 0,005% e fenanzina metassulfato 0,001% (Ackell e col., 1978). Incubou-se as misturas de reação por tempos diferentes, no escuro, a 30^o C e a reação interrompida com a adição de HCl 0,5 M.

A regressão linear das absorbância versus o tempo de incubação nos fornece a atividade da succinato desidrogenase e sua relação com a quantidade proteica dos extratos brutos, a atividade específica.

3.20. Preparação das amostras para dosagem das enzimas digestivas

As larvas de *P.termitilluminans* (com peso médio de aproximadamente 1,0 g) foram imobilizadas colocando-as em gelo e dissecadas a seguir em solução gelada de NaCl 0,34 M (para manter a osmoralidade). Após a remoção de toda a carcaça de quitina e, em seguida, a lipídica que envolve o tubo digestivo do inseto, os segmentos cefálicos, o papo, o IP, o EVA e o EVP e o fluído luminal (F) (coletado do tubo digestivo com o auxílio de um capilar) foram colocados em diferentes tubos de ensaios e mantidos à 4 °C. Os diversos tecidos foram homogeneizados em água gelada. Todas as preparações acima foram então passadas através de uma malha de Nylon de 0,10 mm de poro. Em outros experimentos, os tecidos do tubo digestivo foram homogeneizados e centrifugados a 25.000 g por 30 minutos à 4 °C. O sobrenadante ("fração solúvel") foi transferido para outro tubo de ensaio e o sedimento ("fração de membrana") foi ressuspensão na mesma quantidade de água do sobrenadante. Nenhum sedimento foi visível após a centrifugação deste sobrenadante à 100.000 g por 60 minutos. Todos os homogeneizados continham material de aproximadamente 10 animais.

O material regurgitado foi coletado estimulando-se mecanicamente as larvas a atacarem e morderem um pedaço de papel absorvente e nele injetassem um líquido escuro, o qual serviria para realizar digestão extra corpórea. Os pedaços mordidos foram recortados e mergulhados em água bidestilada

gelada. A solução obtida foi então centrifugada (10.000 g ,
10 min à 4 ° C).

Aproximadamente 10 larvas forneciam cerca de 2 ml de
solução de regurgitado, com atividade suficiente para obter-se
resultados satisfatórios nos ensaios de todas as enzimas,
usando-se 0,01 ml da solução.

Todas as amostras foram estocadas a -20 ° C até serem
usadas.

3.21. Determinação de ativadores e inibidores presentes nos tecidos do tubo digestivo e no regurgitado e/ou fluído luminal

Alíquotas de homogeneizados do epitélio do ventrículo
anterior, médio e posterior foram adicionadas às de fluído
luminal e regurgitado simultaneamente e a atividade total era
medida de tal forma que apresentassem atividades semelhantes. O
resultado era comparado com a soma das atividades nas amostras
ensaiadas separadamente.

3.22. Determinação do pH ótimo de atividade enzimática

Os ensaios enzimáticos foram realizados segundo os
procedimentos sumarizados na Tabela 4.

Para cada determinação, a mistura de reação
(duplicatas) foi incubada por tempos variados. Controles sem en-
zima (brancos de substrato) e sem substrato (brancos de enzima)

Tabela 4. Condições de ensaios e métodos usados na determinação das hidrolases digestivas nas três espécies larvais de elaterídeos estudados. (*P. tenuitarsis*, *P. divergens* e a espécie não identificada de *Pyrophorini*).

Substrato	Concentração	pH ótimo ⁺	Substância ou grupo determinado	Referência
Aminopeptidase	LpNA 1 mM	8.0(6-10)	Nitroanilina	Erlanger e col. (1961)
Amilase	Amido 0.5 %	7.8(5-8)	Grupos Redutores	Noelting e Bernfeld (1948)
Celulase	CMC 1 %	6.5(4-9)	Grupos Redutores	Noelting e Bernfeld (1948)
α -Glicosidase	α -GII 10 mM	6.0(4-8)	α -Nitrofenolato	Terra e col. (1979)
β -Glicosidase	β -GII 10 mM	6.0(4-8)	β -Nitrofenolato	Terra e col. (1979)
Trealase	Trealose 7 mM	6.0(4-9)	Glicose	Dahlqvist (1968)
Tripsina	BAPA 0.83 mM	8.5(6-10)	Nitroanilino	Erlanger e col. (1961)

*

Todos os ensaios foram realizados a 30 °C, em média, nos valores de pH indicado. Os tampões usados (0.05 M) são: Citrato de sódio-fosfato (pH 4 - 7), fosfato de sódio (pH 7 - 8), Tris-HCl (pH 8.2 - 9) e glicina/NaOH (9.2 - 10). O meio de reação com amido continha NaCl 10 mM adicionado ao tampão. As incubações foram feitas em pelo menos quatro períodos diferentes de tempo e a velocidade inicial de hidrólise dos substratos medida. Todos os ensaios foram realizados em condições tais que a atividade foi proporcional a concentração da proteína e o tempo. Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de catalise de quebra de 1 nmol de substrato (ou ligação)/min.

⁺ Os números entre parênteses correspondem às faixas de pH usados nas determinações de pH ótimo.

também foram incubados nas mesmas condições experimentais. A hidrólise de 1 nmol de substrato por minuto corresponde a 1 mU de atividade enzimática.

Os substratos derivados de nitrofenol foram ensaiados num volume total de reação de 0,2 ml e a reação, interrompida pela adição de 1,0 ml de tampão bicarbonato 0,25 M/carbonato 0,2M e SDS 1%. Em experimentos controles, verificou-se que essa concentração de SDS desnatura todas as proteínas ensaiadas. Nessas condições, o coeficiente de extinção molar a 420 nm do p-nitrofenolato é 18.000.

Os açúcares redutores foram ensaiados em presença de DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico) dissolvido em hidróxido de sódio 2,0 N contendo tartarato de sódio e potássio. A reação enzimática foi interrompida por fervura da mistura de ensaio e a absorbância medida a 550 nm contra brancos. Além dos controles de enzima e substrato, para o ensaio da celulose, preparamos um controle, adicionando pedaços de papel idêntico àquele em que é coletado o extrato regurgitado.

As concentrações das proteínas das amostras foram determinadas de acordo com Bradford (1976), como descrito anteriormente (item 3.15.3).

Para a determinação do pH ótimo das luciferases provenientes de abdomen e protórax, preparou-se extratos brutos desses órgãos da maneira como descrito no item 3.9. Estes extratos brutos foram incubados em concentrações iguais (1,0 ml

de extrato bruto) a diferentes pHs de tampões citrato, Tris-HCl e borato-NaOH , todos em concentração 0,1 M. A seguir, adiciona-se o extrato bruto à mistura padrão de reação, à temperatura ambiente, e mede-se a intensidade de luz máxima no comprimento de onda no qual emite preferencialmente o protórax (540 nm) e o abdomen (562 nm). A luz é captada pela fotomultiplicadora do "photon counter".

3.23. Eletroforese em géis de poliacrilamida

As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida de diferentes concentrações, preparados como descreve Hedrick e Smith (1968) em tubos de vidros apropriados, de 5 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento. A separação eletroforética foi obtida com uma corrente elétrica de 2,5 mA para cada gel. A temperatura de corrida foi de 4 ° C.

Em seguida, os géis foram triturados em um fracionador de géis , com tampão fosfato 0,1 Molar pH 7,0 gelado a frações de 9 gotas (correspondente a 3,0 mm do gel) foram coletados (Terra e Ferreira, 1983). As frações coletadas permaneceram por 3 horas em solução à 4 ° C, para uma perfeita eluição e, em seguida, as enzimas foram ensaiadas como descrita na Tabela 4. A recuperação de atividade para as enzimas nos géis foi de 50 - 80%, com excessão da amilase de *P.termitilluminans* que foi em torno de 20%.

3.24. Isoeletrofocalização em géis de poliacrilamida

Foram preparadas géis de poliacrilamida 7,0% com presença de 2,0% de anfolitos pH 3,0-10,0. Para que a aplicação fosse feita ao lado alcalino, sem que a enzima entrasse em contato com a solução de hidróxido de sódio, deixava-se um espaço de 1,0 cm na parte superior do tubo, onde colocava-se 0,15 ml de uma mistura de glicerol 8,0% e 1,4% de anfolitos pH 3,0 - 10,0 em água. Fez-se uma pré-focalização de 30 minutos onde as soluções iônicas são H_3PO_4 1,0 M (em baixo) e NaOH 2,0 N (em cima). Após a pré-focalização, aplicava-se as amostra juntamente com glicerol 11,4% e seguia-se uma eletrofocalização à 4°C por 2 a 3 horas com uma voltagem de 31 V/cm por amostra (Terra e col., 1978).

Após a focalização, os géis foram retirados dos cilindros e divididos, como descrito no ítem 3.23 e ensaiados como descrito na Tabela 4, para as enzimas digestivas.

Para a determinação dos perfis de atividade da luciferase, as frações foram ensaiadas medindo-se a emissão de luz total quando se adicionou luciferina, 1 mM/ ATP, 2 mM/ $MgSO_4$ e EDTA, 1 mM em tampão Tris-HCl 0,10 M pH 7,8.

Para o gradiente de pH, foi preparado um gel de forma semelhante aos demais, com H_2O destilada ao invés das amostras. O pH de suas frações foi medido com um eletrodo de vidro após permanecer em banho por 3 horas à temperatura ambiente.

3.25. Determinação do peso molecular por ultracentrifugação em gradiente de densidade

Amostras de 0,2 ml de regurgitado das espécies de insetos citadas contendo 1,5 mg de hemoglobina bovina e 0,050 mg de catalase de fígado bovino foram aplicadas no topo de gradientes contínuos de glicerol (glicerol de 5,0 a 30,0%, P/V, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0) de 4,6 ml. Os gradientes foram centrifugados a 96.000 g por 15 horas à 4 °C e alíquotas de 0,2 ml foram coletadas a partir do fundo de cada tubo com o auxílio de uma bomba peristáltica (Terra e Ferreira, 1983). O peso molecular das enzimas ensaiadas nas frações foi calculado usando-se a seguinte fórmula (Martin e Ames, 1961);

$$P.M. = \left(\frac{Mr}{Mr_{padr\tilde{a}o}} \right)^{1,5} \times P.M. \text{ padr\tilde{a}o}$$

O símbolo P.M. corresponde ao peso molecular a ser calculado e Mr à migração relativa da amostra. Usamos como padrão de referência as sedimentações de hemoglobina (P.M. = 64.000) e catalase (P.M. = 232.000) adicionados à amostra. A posição da hemoglobina nos gradientes foi verificada determinando-se a absorbância das frações a 545 nm e a da catalase, utilizando-se ensaios da enzima segundo Martin e Ames (1961). A recuperação da atividade das enzimas aplicadas ao gradiente permaneceu entre 60 e 80%.

2.26. Determinação da Constante de Michaelis-Menten

Os ensaios realizados são os mesmos descritos na Tabela 4, porém com variação da concentração dos substratos. O tampão e o tempo escolhidos foram aqueles em que a enzima exibe maior atividade. Para cada concentração, foram realizados três ensaios independentes e três brancos e o resultado representa a média aritmética dos resultados. A variação da concentração dos substratos está mostrada na Tabela 5. Todos os cálculos das constantes foram feitas baseados nos programas estatísticos de Wilkinson (1961) com regressões lineares ponderadas.

Para a determinação do K_m para luciferases de *P. divergens* adulto, os ensaios foram realizados medindo-se a luz total emitida de incubações de ATP (0,096 - 1,16 mM), e luciferina (1,0 - 15 μ M), em presença da luciferase ativa nos extratos brutos (preparados da mesma maneira que a descrita no item 2.9) de protórax e abdomen. O tampão utilizado é o Tris-HCl 0,10 M pH 7,8 contendo $MgSO_4$ e EDTA. Para cada concentração, foram realizados três ensaios independentes e três brancos e o resultado representa a média aritmética dos resultados.

Tabela 5. Condições de ensaio dos substratos para cálculo da constante de Michaelis-Menten das enzimas digestivas presentes no regurgitado/material fluído do tubo digestivo.

Enzima	Variação da Concentração	Tampão 0,2 M	Tempo de Incubação
Tripsina	0,05 - 0,4 mM	Fosfato pH 8,0	40 min.
Aminopectidase	0,2 - 1 mM	Fosfato pH 8,0	30 min.
α -glicosidase	0,2 - 10 mM	Cit.Fosfato pH 8,0	1 h
β -glicosidase	0,2 - 10 mM	Cit.Fosfato pH 6,0	1 h
Trealase	0,05 - 1,5 mM	Cit.Fosfato pH 6,0	1 h
Celulase	0,1 - 4 %	Cit.Fosfato pH 7,0	3 h
Amilase	0,05 - 0,5 %	Fosfato pH 7,0	3 h

4. Resultados e Discussão.

4.1. Dados Gerais de Laboratório e Campo.

4.1.1. Coleta e Criação de Elaterídeos:

Os elaterídeos luminescentes adultos podem ser coletados em florestas ou próximo delas durante as noites quentes e úmidas do verão e primavera. Eles voam alto sobre as árvores e, para tornar mais fácil sua captura pode-se usar uma lanterna ou um pedaço de madeira incandescente para atraí-los. Alguns deles são coletados e colocados em caixas transparentes, facilitando a atração/coleta de outros espécimens. Na área de São Paulo, observamos, em duas vezes consecutivas e durante uma semana toda, que o voo nupcial de *P.divergens* ocorre entre um pequeno espaço de tempo, exatamente após o pôr do sol (19:15 - 19:25 hs). Nestas ocasiões, todos os espécimens coletados durante o voo eram machos. As fêmeas foram encontradas andando sobre o mato com as lanternas verdes protorácicas acesas. Com respeito a essa observação, lembramos que Lloyd (1978) descreveu padrões distintos para a localização dos espécimens de lampirídeos durante o voo nupcial. Seriam os sinais de localização de *P.divergens* parecidos aqueles sistema II típicos para *Photinus*, *Aspisisoma* e alguns *Luciola* (Lampyridae), no qual um sexo (usualmente os machos voam) emite um sinal espécie-específico, e o outro responde com o sinal espécie-específico, advertindo-o para aproximar-se?

As larvas de elaterídeos habitam galerias escavadas dentro de troncos em fase de apodrecimento e podem ser achadas sob pequenas lascas retiradas com machadinhas ou facões. Na verdade, são muito difíceis de serem encontradas. Segundo Crowson (1981) e Costa (1975), larvas de elaterídeos também podem ser encontradas no chão, porém em nosso trabalho de coleta, isto não foi observado. No caso de *P.termitilluminans*, as larvas são coletadas em "cupinzeiros luminescentes", durante a noite. Com uma picareta removem-se grandes pedaços do cupinzeiro, os quais são então em seguida quebrados em pequenos pedaços com as mãos. As larvas denunciam sua presença pela intensa emissão luminosa de tonalidade verde, porém elas retornam rapidamente para dentro dos tuneis quando são perturbadas, tornando assim mais difícil a sua captura.

No laboratório temos criado larvas de *P.divergens* eclodidas de ovos coletados de fêmeas fertilizadas, mantidas isoladamente em caixas plásticas contendo areia esterelizada umidecida e alimentadas com larvas de *Tenebrius*, diplópoda, operárias de cupins ou ração de gato. Utilizando este procedimento, conseguimos obter 85% de sobrevivência das larvas iniciais após dois anos. Recentemente, termostatizando o laboratório a 25 °C, esperamos otimizar a criação destas larvas bem como viabilizar a criação de fengodídeos, tão sensíveis a dias muito quentes.

4.1.2. Observações Visuais da Bioluminescência.

Os adultos da maioria dos Elateridae luminescentes possuem dois órgãos luminosos localizados lateralmente no protórax, os quais brilham continuamente quando em repouso, andando ou quando o pegamos, e um grande órgão luminescente ventral colocado no primeiro segmento abdominal, o qual somente é visto quando exposto forçadamente ou quando o inseto está voando (Biggley e col., 1967). O mesmo padrão também é observado para espécies de Pyrophorini e Hapsodrilini estudados por nós. Interessante citar que o fato de que quando adultos de *P.divergens* são secos sob pressão reduzida em presença de pentóxido de fósforo, sua lanterna abdominal fica dramaticamente exposta, brilhando continuamente e intensamente por horas, com uma gradual troca de emissão de luz do verde amarelado para o vermelho.

Anteriores citações mencionam que a luminescência das larvas de Elateridae aparecem somente após vários meses de idade (Costa, 1975). Este não é o caso para *P.divergens* e *P.termitilluminsans*, onde a emissão de luz foi observado em todos os estágios larvais. Para o primeiro caso o protórax é o segmento mais brilhante; no outro, o protórax e os dois últimos segmentos abdominais brilham intensamente. Quando larvas de *P.divergens* são perturbadas com um pincel macio, sua reação nos 2-3 primeiros minutos foi escapar da "agressão". Subitamente elas emitem luz intensamente no protórax e atacam o pincel, regurgitando ao mesmo tempo um fluído de coloração escura. A alta

atividade de proteases e glicosidases contidas no regurgitado será discutida posteriormente. A mesma observação de que a bioluminescência ocorre associada com ataque concorda com a de Bianchi (1937), que estudando a emissão de *Deilelater bellamui* mostrou que invariavelmente o ato de emissão/agressão constitui o mais vigoroso mecanismo de defesa. No caso de *P.termitilluminans*, a qual habita galerias escavadas na superfície de cupinzeiros, a emissão de luz ocorre sempre em seguida ao pôr do sol, e serve para atrair presas aladas (Redford, 1982). A emissão de luz pelos elaterídeos (larvas e adultos) está sob controle neurológico (Case e Strause, 1978). Isto é indicado pelo fato de que larvas de *P.divergens* brilham a qualquer hora do dia ou da noite somente sob perturbação com o pincel. Nenhuma bioluminescência pode ser detectada quando elas são mantidas separadamente em frascos de vidros, em um fotômetro, por três dias consecutivos. Diferentemente, larvas de *P.termitilluminans* coletadas a aproximadamente seis meses nos "cupinzeiros luminescentes" e mantidos no laboratório, continuam a brilhar precisamente após o pôr do sol. Tem "memória" do campo, onde à noite emitem para caçar presas aladas. Interessantemente, uma grande porção de um cupinzeiro infestado de larvas de *P.termitilluminans*, transportada para o laboratório, sempre apresentou larvas brilhantes expostas na superfície quando foi borrifada com água e no escuro.

Embora Dubois (1886) tenha reportado que ovos de

P.noctilucus brilhavam fracamente, Bianchi (1937) e Costa (1970) não observaram este fenômeno nas espécies estudadas por eles. No caso de *P.termitilluminans* nós não só pudemos observar a bioluminescência de seus ovos, com olhos adaptados ao escuro, mas também registramos seus espectros (Figura 9-G). Tanto ovos como pupas luminescem fracamente e continuamente, porém mais intensamente quando agitados ou manuseados. Devido a sua relativa imobilidade, ovos e pupas podem talvez contar com sua luminescência como proteção contra possíveis predadores (especialmente formigas e soldados de cupins, no caso de *P.termitilluminans*; Lloyd, 1983). A propósito, nos "cupinzeiros não-luminescentes" encontrados no Brasil Central (Parque Nacional das Emas e Fazenda Santo Antônio) próximos dos "cupinzeiros luminescentes" existe uma grande população de espécies extremamente agressivas de formigas e soldados de cupins (Redford, 1984).

4.1.3. Os Cupinzeiros Luminescentes

Durante esses quatro anos de pesquisa sobre bioluminescência empreendemos quatro expedições para a região do Parque Nacional das Emas, localizada no extremo sul do estado de Goiás, onde os rios Taquari, Araguaia e Formoso têm suas cabeceiras e as tribos indígenas Caipós viveram outrora, para coleta de insetos luminescentes e estudo do "habitat". Uma dessas expedições foi começo das estações de chuva (Outubro), e as outras no início do mês de Abril.

Em outubro, à noite, precisamente após o pôr do sol (7:15) os cupinzeiros, densamente distribuídos nos campos de pastagens, começam a brilhar. Nas noites de tempo úmido e quente e de lua nova, os cupinzeiros mostram o mais espetacular fenômeno bioluminescente. Foi possível contar aproximadamente uma centena de murunduns luminosos num círculo de raio de visão de quase 100 m. Estes murunduns são grosseiramente cônicos, quando não têm sua base destruída por tamanduás à procura de formigas e/ou cupins; eles têm cerca de 1,5 m de altura porém alguns deles atingem até 2,3 m. A face dos cupinzeiros exposta para o lado do pôr do sol contém um maior número de "pontos" verdes luminosos, aproximadamente duas vezes maior que os encontrados na parte de trás ou na lateral. Também é interessante o tipo de distribuição em gradiente dos pontos luminosos verticalmente na superfície do cupinzeiro, decrescendo em direção ao topo, porém com uma maior população de "pontos" grandes no segundo ou terceiro quarto superior e uma maior frequência de pontos pequenos próximos da base (observe a foto colocada como capa da tese) . De fato, pode-se coletar principalmente larvas luminescentes de primeiros estágios (0,1 - 0,5 cm de comprimento) na base do cupinzeiro e larvas mais velhas (2 - 3 cm) no meio. É muito raro encontrar-se larvas luminescentes no topo do cupinzeiro.

A um simples toque no cupinzeiro luminescente, ele "apaga-se" imediatamente: as larvas luminescentes retrocedem rapidamente para o interior de suas galerias.

Durante a noite, os campos de pastagens iluminados atraem nuvens de alados das florestas e matas das redondezas. De fato, especialmente após as tardes quentes e umidas (chuvosas), centenas de alados (principalmente besouros e mariposas) revoam ao redor dos cupinzeiros e algumas são capturadas pelas larvas luminescentes e outros predadores (principalmente aranhas e centípedes) na superfície do cupinzeiro. As larvas luminescentes também pegam presas oferecidas com a mão: uma a uma são carregadas para o interior dos tuneis onde elas são estocadas. As hidrolases, contidas no regurgitado e injetadas pelas larvas nas presas, preparam-nas para a digestão interna. Um grande pedaço (ca 80 Kg) de um cupinzeiro luminoso, contendo 28 pontos brilhantes, foi transportado para o laboratório. As larvas foram diariamente alimentadas com operárias de cupins; elas saíam para a boca do tunel para receber comida a qualquer hora do dia desde que estivesse escuro, quente e água fosse esborrifada sobre o cupinzeiro. Esta amostra de termiteiro, contendo cupins e *P.termitilluminans* foi mantida "viva" no laboratório termostaticado à 25 °C, por cinco meses.

Muitos termiteiros foram completamente pulverizados com as mãos por uma equipe de seis pessoas (cerca de 4 horas de trabalho por termiteiro) e sua fauna coletada, fixada em álcool etílico 80%, e doada ao MZUSP. Cada cupinzeiro continha entre 200 a 800 larvas e algumas pupas e imagos de *P.termitilluminans*, vários gêneros de cupins (por exemplo *Cornitermes*, *Paracornitermes*, *Spinitermes* e *Embiratermes*), formigas, larvas de Diptera, larvas e

adultos de Coleoptera (Tenebrionidae, Dermestidae, Scarabidae, Cicindelidae, Cantharidae e Carabidae), aranhas, centípedes, miliápodes e opiliões.

Observamos a não ocorrência de inquilinismo de larvas de *P.termitilluminans* em cupinzeiros de coloração cinza localizados em áreas úmidas e baixas os quais são ocupados por espécies extremamente agressivas de cupins e formigas. Nos cupinzeiros de coloração marron, larvas, pupa e adultos de *P.termitilluminans* podem ser encontrados em outubro.

Em março/abril, devido a distância, os cupinzeiros aparentemente não brilham. Entretanto com a aproximação, observa-se um anel luminoso esverdeado ao redor do cupinzeiro, próximo à base. Centenas de pequenos "pontos", correspondendo a larvas de primeiros estágios de *P.termitilluminans* (< 2mm), foram pinçados de amostras da terra removida com uma pá.

Com o objetivo de melhor entender o inquilinismo das larvas luminescentes e checar as possíveis conexões com os túneis das larvas e dos cupins, os quais poderiam prover alimento para as larvas fora da estação de chuvas, preparamos moldes de polímeros das galerias das larvas. A porção do cupinzeiro submetida à moldagem foi mergulhada em solução aquosa de NaOH 10% para dissolvê-lo. Não se sabe nada ainda sobre a composição química da saliva do cupim que é usada, juntamente com terra e fezes para preparar a massa de construção do cupinzeiro.

As fotografias 4 e 5 sugerem: (i) existência de uma intrincada malha interna e superficial (cerca de 0,5 cm de profundidade) de túneis com 0,1 a 0,3 cm de diametro, permitindo uma intercomunicação entre as galerias, (ii) frequentemente dois túneis se fundem para formar outro túnel projetado para o interior do cupinzeiro (10-15 cm de profundidade) perpendicularmente à superfície, (iii) os moldes desses tuneis perpendiculares foram interrompidos quando havia larvas em seu interior, porém, em alguns casos de túneis desocupados, eles se mostravam curvos, em forma de "U", interligando a malha com a abertura para o exterior (foto 4), (iv) lateralmente, no ramo que desemboca no exterior há um átrio a aproximadamente 1,0 cm distancia da superfície externa. O volume interno do átrio é tanto maior quanto mais grosso é o calibre do túnel correspondente. Esse átrio parece ser o local onde a larva luminescente estoca sua presa para pré-digestão e, em seguida a digere; por ser mais espaçoso talvez a larva consiga mais facilmente virar-se neste local do tunel e mover-se em direção oposta na malha, (v) em apenas um caso foi observado uma pequena conexão entre os túneis dos elaterídeos e uma galeria não identificada (possivelmente de cupins). Pode-se observar melhor esta conexão na foto 5.

Podemos sugerir, por estes moldes e pelas nossas observações visuais, a seguinte hipótese para a infestação dos cupinzeiros pelas larvas de elaterídeos: na primavera fêmeas adultas de *P. termitillum* colocam seus ovos na terra

próximo ao cupinzeiro luminescente (a luz proveniente deve atuar como um sinal de que a fauna desse cupinzeiro não é tão agressiva). Semanas depois, centenas de larvas de primeiros estágios formam o anel luminoso próximo à base do cupinzeiro. A rica microfauna do solo, bem como as larvas mais frágeis servem de alimento para a seleção de larvas mais fortes. Conforme vão crescendo, as larvas vão subindo o cupinzeiro, escavando túneis nos locais mais macios, ou invadindo tuneis previamente

Foto 4. Polimerização das galerias do cupinzeiro.

Foto 5. Moldagem das galerias dos cupinzeiros "luminosos"
mostrando o átrio em uma galeria de elaterídeo.

construídos. As larvas mais velhas ocupam áreas mais altas do cupinzeiro, tornando-o cheio de pontos fortemente brilhantes e esverdeados, que são observados em outubro. A malha de túneis interligados (Foto 4; observar o emaranhado de túneis moldados pela resina próximo à superfície externa) facilita o movimento livre das larvas dentro das galerias que definem seu território. Assim, um vento direto e frio pode causar retração das larvas para outros locais onde o esfriamento não atinge.

Indubitavelmente, cada larva tem um certo domínio que está representado por uma galeria em forma de "U" que contém a abertura externa para caça e o átrio para estocar as presas sob digestão extra-corpórea (veja "enzimas digestivas"). Quando retornam para o átrio, as larvas encontram a capa de quitina da presa contendo uma "sopa" de olipeptídeos e oligocarbohidratos.

Pode-se especular que a intensa luz esverdeada emitida pelos segmentos finais da larva de *P. termitilluminans*, não presente em outras larvas de elaterídeos, pode servir como um tipo de "lanterna traseira", como um sinal para avisar de sua presença no túnel para outras larvas. A existência de várias larvas no emaranhado de túneis (frequentemente uma/10² cm²), poderia causar uma verdadeira batalha entre as larvas de *P. termitilluminans* e uma poderia injetar na outra o letal "coquetel enzimático digestivo". Se no caso de *P. termitilluminans* também ocorrer recobrimento entre o espectro visual e o da bioluminescência, como já foi demonstrado ocorrer para Lampyridae (Seliger, 1982a, 1982b), então, no túnel, a larva poderia enxergar uma que está à sua frente bloqueando a

passagem, com a "lanterna traseira" acesa.

Observações de campo e prévias citações de Redford (1984) confirmam que os cupinzeiros são primeiramente construídos pelos cupins *Cornitermes cumulans*, espécie extremamente agressiva. Após isto outras espécies de cupins (*Paracornitermes*, *Spinitermes* e *Embiratermes*) atacam os cupinzeiros construídos e abandonados pelos *Cornitermes*. De fato, nós nunca encontramos larvas de *P.termitilluminans* em cupinzeiros ocupados pelos *Cornitermes*. Durante uma noite, nós assistimos a reconstrução de termiteiro anteriormente destruído com uma serra; operárias de *Cornitermes* fizeram o trabalho, reconstruindo um terço da parte removida. Os padrões das recentes galerias construídas (Foto 6) são os mesmos moldados com polímero nos cupinzeiros abandonados pelos *Cornitermes* e infestados por *P.termitilluminans*.

Foto 6. Reconstrução do cupinzeiro por operárias de *Cornitermes*, durante uma noite.

4.2. Bioluminescência de Elaterídeos: Estudos Bioquímicos

4.2.1. Resultados.

A Tabela 6 sumariza os dados cromatográficos obtidos com a luciferina presente nos extratos brutos preparados de catorze espécies de Elateridae (Pyrophorini e Hapsodrilini). Em algumas dessas espécies, a luciferina foi analisada nos quatro estágios de metamorfose e nos adultos de outras, para machos e fêmeas e para os órgãos luminescentes localizados no abdômen e no protórax. Foram utilizados cinco sistemas cromatográficos para distintos constatar a natureza química da luciferina. Em todos os experimentos a migração relativa (Rf) desse substrato luminescente foi comparado com a de luciferina sintética (comercial) vagalumes. Nas mesmas condições cromatográficas, nenhuma mancha fluorescente foi detectada quando se analisou extratos de larvas e adultos de Pyrophorini não luminescentes (*C. zonatus* e *C. malleatus*).

Nos últimos quatro anos, analisamos cromatograficamente a natureza química da luciferina de Elateridae (cinco gêneros, duas tribos). E, nessas espécies, independentemente do estágio do ciclo de vida, do sexo e proveniência dos órgãos luminescentes (abdômen ou protórax, no adulto) parece ser a luciferina a mesma da encontrada para os Lampyridae (Tabela 6). Mais recentemente, investigamos o efeito da dose de ¹⁴C-cistina (precursor) e do tempo de incorporação na

Tabela 6. Caracterização da luciferina em extratos brutos de espécies de Elateridae por Cromatografia de Camada Delgada.

* Adsorvente-eluyente	Migração relativa	
	Extrato de Elateridae +	Luciferina sintética (Lampyridae)
Silica gel-solv. A	0.82	0.83
Silica gel-solv. B	0.71	0.71
Silica gel-solv. C	0.12	0.12
Celulose-solv. A	0.83	0.82
Celulose-solv. B	0.92	0.93

*

Veja Materiais e Métodos.

+

Os extratos brutos provenientes das seguintes espécies foram analisados: *Pyrophorus divergens* (larva, pupa, adulto-protórax e abdomen); *Pyrophorus punctatissimus* (adulto-protórax e abdomen); *Pyrearinus candelarius* (larva, adulto-protórax e abdomen); *Pyrearinus micatus* (larva, adulto-protórax e abdomen); *Pyrearinus candens* (larva, adulto-protórax e abdomen); *Pyrearinus janus* (larva, adulto-protórax e abdomen); *Pyrearinus lineatus* (larva, adulto-protórax e abdomen); *Pyrearinus termitilluminans* (ovo, larvas, pupa e adulto-protórax e abdomen); *Hapsodrilus ignifer* (adulto-protórax e abdomen); *Hapsodrilus pyrotis* (adulto-protórax e abdomen); *Hapsodrilus* sp. (adulto-protórax e abdomen); *Opseleater pyrophanus* (adulto-protórax e abdomen); *Pyroptesis maculicollis* (adulto-protórax e abdomen).

biossíntese da molécula de luciferina. Para isto, injetamos nos segmentos abdominais de larvas de *P.termitillumians* L-¹⁴C-cistina. A Figura 6 mostra os cromatogramas das placas obtidas após serem secas e sua frações de 0,5 cm serem pulverizadas e solubilizadas em líquido de cintilação. Esta figura traz os perfis de aplicações com três dosagens diferentes (1, 2 e 3 μ l) de cistina radiativa durante três períodos diferentes de tempo de incorporação. Uma resposta linear da síntese de luciferina pode ser visualizada na Figura 6.a,c e e. A Figura 7 mostra a curva temporal da incorporação da cistina pela luciferina, com um rendimento radioquímico de ca de 4%. A curva inserida na Figura 7 representa a curva de incorporação obtida por Okada e col. (1974), quando os autores alimentaram lampirídeos adultos com 2-ciano-6-hidroxibenzotiazol (um possível intermediário) radiativo e mediram a sua incorporação na luciferina.

As Figuras 8, 9 e 10 mostram os espectros de emissão de luz "in vivo" obtidos de vários estágios do ciclo de vida de doze diferentes espécies de Elateridae. Os espectros de emissão de lanternas do protórax e do abdomen, de macho e de fêmea são também comparados nessas Figuras. As curvas normalizadas não estão corrigidas para a resposta da fotomultiplicadora e representam médias obtidas independentemente (Materiais e Métodos). A Figura 11 ilustra o efeito da adição de extratos brutos de abdomen denaturados de *P.divergens* em extratos ativos do protórax da mesma espécie e "vice-versa" e a Figura 12 representa as curvas semelhantes com a adição de extratos ativos.

Figura 6. Efeito da dose de ¹⁴C-cistina e do tempo de incorporação na biossíntese da luciferina em larvas de *P. termitilluminans*. Experimento descrito no item 3.11. As frações 16-18 contêm a luciferina, identificada na placa original (antes da raspagem da sílica para contagem por cintilação), sob irradiação com UV e por autoradiografia, usando-se luciferina padrão como referência.

Figura 7. Porcentagem de incorporação de C-cys em¹⁴ luciferina (rendimento radioquímico) em função do tempo. A porcentagem foi calculada tomando-se como base a radiatividade da cistina injetada nas larvas. A figura inserida é aquela obtida por Okada e col.(1974) ao alimentar lampirídeos adultos com 2-ciano-6-hidroxibenzotiazol.

Figura 3. Espectros normalizados de bioluminescência "in vivo" de diferentes espécies: **A**, *P. punctatissimus*; **B**, *P. divergens*; **C**, *Pyrophorus* sp. e **D**, *O. pyrophanus*. Os números referem-se aos estágios do ciclo de vida dos animais: (1) Ovo, (2) Larva, (3) Pupa e (4) Adulto (—, macho protórax; ---, fêmea protórax; - o -, macho abdomen). Esses espectros não foram corrigidos para a resposta da fotomultiplicadora.

Figura 9. Espectros de bioluminescência "in vivo" das espécies: **E**, *P. candelarius*; **F**, *P. candens*; **G**, *P. termitilluminans*; **H**, *P. micatus*. Veja legenda da Figura 8.

Figura 10. Espectros de bioluminescência "in vivo" das espécies: **I**, *P. lineatus*; **J**, *P. janus*; **K**, *H. ignifer*; **L**, *Hapsodrilus* sp. Veja legenda da Figura 8.

Figura 11. Espectros de bioluminescência de extratos brutos de lanternas abdominais e torácicas de *P. divergens* (—). Mistura de reação: 0,1 ml de extrato em 3,0 ml de tampão Tris-HCl 0,20 M pH 7,8 à temperatura ambiente contendo luciferina 1 mM; ATP 5,6 mM; MgSO₄ 4 mM e EDTA 1,0 mM. A distribuição espectral de cada extrato não é alterada pela adição do extrato inativado por aquecimento (0,1 ml) da outra lanterna (-----).

Figura 12. Espectros de bioluminescência de extratos brutos (0,2 ml) do órgão luminoso torácico de *P. divergens* (n=5), antes e após a adição de 50 μ l do extrato abdominal correspondente na mesma mistura de reação (A), e vice-versa (B; 0,1ml do extrato bruto da lanterna do abdomen mais 0,2 ml de extrato torácico). As linhas tracejadas representam o espectro diferencial calculado (A, max 562 nm; B, max 540 nm). A mistura de reação é igual à descrita na legenda da figura 11.

As Figuras 13 e 14 mostram algumas curvas normalizadas obtidas de extratos brutos de protórax e abdomen, respectivamente, de várias espécies de elaterídeos . A tabela 7 compara os máximos médios de emissão (nm) de espectros "in vivo" e "in vitro" obtidos de 12 espécies diferentes de Elateridae; estes valores foram corrigidos para a resposta da fotomultiplicadora.

A intensidade da bioluminescência emitida por ovos de *P.termitiluminans* é constante a uma dada temperatura e responde logaritmicamente ao aumento da temperatura. A Figura 15 mostra as curvas de aquecimento (termostatização) de amostras contendo cerca de 50 ovos de elaterídeos. Quando as intensidades de emissão correspondentes aos patamares são projetadas segundo Arrhenius, obtêm-se linhas retas, como mostrado pela Figura 16. A energia de ativação aparente calculada para essa resposta é de aproximadamente 25 kcal/mol. Em experimentos similares utilizou-se larvas de tamanho e idade variados de *P.termitiluminans* (n = 4) a sete temperaturas distintas entre 18 a 45 ° C e a energia de ativação aparente calculada é de 26 ± 3 kcal/mol. Para fins comparativos a energia de ativação para a reação bioluminescente também foi obtida com extratos brutos (preparados como descrito em Materiais e Métodos) de ovos de *P.termitiluminans*, adicionados à mistura padrão de reação (Luciferina-ATP-Mg²⁺ em tampão Tris-HCl; veja as condições em Materiais e Métodos) e com luciferase comercial de *Photinus pyralis* purificada. As projeções de Arrhenius correspondentes também são mostradas na Figura 16; os valores

Figura 13. Espectros de bioluminescência *in vitro* do órgão luminescente proveniente do protórax das espécies:
1, *P.micatus*; 2, *H.ignifer*; 3, *P.divergens*;
4, *O.pyrophorus*; 5, *P.candelarius*.

Figura 14. Espectros de bioluminescência *in vitro* do órgão luminescente do abdômen das espécies: 1, *P.micatus*; 2, *H.ignifer*; 3, *P.divergens*; 4, *O.pyrophanus*; 5, *P.candelarius*.

Figura 15. Efeito da temperatura na intensidade da bioluminescência de ovos fertilizados (n=50) de *P.termitilluminans*.

Figura 16. Projeções de Arrhenius para a intensidade de bioluminescência de ovos fertilizados de *P. teixemilluminans* (●). Foram examinadas quatro amostras com 50 ovos cada ($E_a = 25,0 \pm 0,6$ kcal/mol). Para comparação, esta figura também mostra as linhas correspondentes ao efeito da temperatura na intensidade de bioluminescência de extratos brutos de ovos (○; $E_a = 16 \pm 1$ kcal/mol) e de luciferase comercial de vagalume (△; $E_a = 10 \pm 1$ kcal/mol), em tampão Tris-HCl 0,10 M pH 7,8 contendo luciferina (1,24 mM), ATP (2 mM) e MgSO (10 mM)

Tabela 7. Máximos de comprimento de onda do espectro de bioluminescência de espécies de Elateridae em diferentes estágios de seu ciclo de vida .

Espécies de Elateridae		+ n	λ_{max} (nm)	
			in vivo	in vitro
Pyrophorini:				
<i>Pyrophorus divergens</i>	Adult ♂ and ♀ (prot.) ♂ and ♀ (abd.) Larva Pupa	26 12 6 3	541 562 560 550	540 562
<i>Pyrophorus punctatissimus</i>	Adult ♂ and ♀ (prot.) ♂ (abd.) Larva Pupa	3 3 2 2	545 575 524 536	
<i>Pyrophorus</i> sp.	Adult ♂ and ♀ (prot.)	2	545	
<i>Pyrearinus candellarius</i>	Adult ♂ and ♀ (prot.) ♂ and ♀ (prot.) ♂ and ♀ (prot.)	15 10 4	544 536	538 543 545 549
<i>Pyrearinus micatus</i>	Adult ♂ (abd.)	2	525	
<i>Pyrearinus candens</i>	Adult ♂ and ♀ (prot.) ♂ and ♀ (abd.)	2 2	562 537	
<i>Pyrearinus janus</i>	Adult ♂ (prot.)	2	539	
<i>Pyrearinus lineatus</i>	Adult ♂ (prot.)	3	550	
<i>Pyrearinus tenuitelluminans</i>	Adult ♂ and ♀ (prot.) Egg Larva Pupa	15 3 2 4	532 537 544 550	532 536
<i>Opelater pyrophorus</i>	Adult ♂ and ♀ (prot.) ♂ (abd.)	2	551 542	
Hapsodrilini:				
<i>Hapsodrilus ligniger</i>	Adult ♂ and ♀ (prot.) ♂ and ♀ (abd.)	3 2	542 584	554 555
<i>Hapsodrilus</i> sp	Adult ♂ (prot.)	3	559	

* Os valores dos máximos de emissão foram obtidos do espectro corrigido para a resposta da fotomultiplicadora. A exatidão na determinação das posições dos picos é de ± 2 nm e a precisão com qualquer espécime, ± 1 nm.

+ n representa o número de espécimes de uma dada espécie usada para as determinações do λ_{max} in vitro. No caso *P. tenuitelluminans*, as amostras para a obtenção do espectro de bioluminescência de ovos continham 200 ovos.

‡ Extratos brutos foram preparados de pelo menos dez espécimes de cada espécie. Para a preparação veja Materiais e Métodos.

das energias aparentes de ativação são 16 e 10 kcal/mol, respectivamente.

Com respeito à natureza físico-química das luciferases dos elaterídeos, muito pouco é conhecido. Elas nunca foram isoladas e caracterizadas. Estudos preliminares com extrato bruto ativo de órgãos luminescentes provenientes do abdomen e do protórax de *P. divergens* estão resumidos na tabela 8. Esta tabela traz os valores da constante de Michaelis-Menten, os pontos isoelétricos encontrados e pH ótimo de emissão. As curvas de emissão de luz com a variação do pH estão representadas nas Figuras 17 e 18.

Tabela 8. Parametros físico-químicos da luciferase proveniente de extratos brutos de lanternas de protórax e abdomen de *P. divergens*.

Luciferase	Km		pH ótimo	pI
	LH ₂ (μM)	ATP (mM)		
abdominal	18,3 + 0,2	0,78 + 0,08	8,0	7,8 e 6,5
protoráxica	7,3 + 1,0	0,79 + 0,08	8,0	7,8

*Veja condições de determinação dos parâmetros em Materiais e Métodos.

Figura 17. Curva representativa do pH ótimo da luciferase presente no extrato bruto do órgão luminescente do protórax de *P. divergens* adulto. Os pontos representam médias de três determinações independentes e o máximo de emissão foi medido após 30 segundos do início da reação. Os extratos foram ensaiados em tampão citrato, Tris-HCl e Glicina-NaOH 0,1 M contendo EDTA 1 mM, MgSO_4 10 μM , luciferina 1,25 mM e ATP 20 mM.

Figura 18. A Perfil de pH para a atividade da luciferase de origem abdominal. Veja legendas da Figura 17.

4.2.2. Discussão:

Os espectros "in vivo" de bioluminescência registrados para duas espécies de Hapsodrilini (dois generos) e dez de Pyrophorini (três gêneros) estudadas, exibem as seguintes características (Figura 8, 9 e 10 e Tabela 7):

(i) Machos e fêmeas de uma dada espécie não mostram significantes diferenças no espectro de luz emitida, tanto pelas lanternas protorácicas (*P.divergens*, *P.punctatissimus*, *P.candelarius*, *P.termitilluminans*) ou pelo órgão luminescente abdominal (*P.divergens*, *H.ignifer*). Esta concordância do máximo de emissão sugere que a cor da bioluminescência em Elateridae deve ser importante para evitar inter cruzamento de espécies. A mesma observação foi feita por Buck (1940) quando estudou a emissão de luz de machos e fêmeas de *Photinus pallens* (Lampyridae).

(ii) Distintas cores de emissão nas lanternas protorácicas ("verde") e abdominal ("vermelho") descritos previamente por Buck (1940) e Biggley e col.(1967) para *P.plagiophthalmus* e por outros pesquisadores para outras espécies (Tabela I em Biggley e col.,1967) foi também encontrado por nós para quatro espécies distintas (Tabela 7), ou visualmente, para todas as 12 espécies.

(iii) Há uma marcante repetibilidade nos espectros de emissão registrados para uma dada espécie, apesar de os espécimens terem sido coletados em distintos nichos ecológicos (com até 1.500 Km de distância). Por exemplo, no caso de *P.divergens* (n = 26) e de *P.candelarius* (n = 15) coletados em diferentes regiões, o comprimento de onda máximo de emissão é inferior a

2 nm. Os máximos de comprimento de onda estão no intervalo de 525 nm (*P.candens*) a 559 nm (*Hapsodrilus* sp.) no caso de lanternas protorácicas e de 562 nm (*P.divergens*) a 584 nm (*H.ignifer*) quando de origem abdominal. Vapores de acetato de etila, catecolamina, estímulo elétrico e instrumentos cirúrgicos para estimular a bioluminescência foram excluídos neste estudo para garantir confiança na exatidão da distribuição dos dados espectrais. A variação das cores da bioluminescência observada nos elaterídeos é também comum nos lampirídeos. Seliger e col., (1982a, 1982b) sugeriram recentemente que a cor da bioluminescência e a sensibilidade visual espectral tiveram papel importante para as espécies de Lampyridae durante a evolução. De acordo com estes investigadores, as cores da bioluminescência dos vagalumes são adaptações espécie-específicas para otimizar a detecção da emissão de luz nos diferentes meios ambientes em que as espécies evoluíram.

(iv) Interessante é o fato de que a distribuição espectral da bioluminescência desloca-se da região do "verde" para o "vermelho" quando o inseto passa de ovo a adulto na metamorfose (Tabela 7). Isto foi observado para o caso de *P.termitilluminaans* e *P.punctatissimus*, mas não para *P.divergens*, tomando-se como referência a lanterna protorácica, já que é a mais brilhante nas larvas e pupas. Em todos os casos, observa-se que a distribuição espectral é simétrica, sugerindo assim que não estamos medindo a soma da bioluminescência torácica e abdominal. Observando-se os ovos dos insetos luminescentes em salas escuras, nota-se que algumas

parecem brilhar mais que outros, sugerindo assim que, provavelmente a emissão registrada é proveniente de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento.

Desde que a luciferina contida em extratos brutos de treze espécies (tanto lanternas de protórax como de abdômen de inseto adulto, macho e fêmea, pupa, larvas ou ovos) apresentou uma mancha fluorescente de coloração azul-esverdeado com idêntico valor de migração relativa (Rf) em cinco distintos sistemas de CCD com os de luciferina de vagalumes, pode-se seguramente sugerir que elas são quimicamente idênticas (Tabela 6). A existência de luciferinas idênticas para vagalumes e pirilampos já havia sido sugerido por outros pesquisadores, baseados nas reações cruzadas de luciferinas de algumas espécies de Lampyridae com luciferases de Elateridae e "vice-versa", obtidas nos anos sessenta (McElroy e col., 1965 e demais referências do trabalho). Posteriormente, McCapra e Razavi (1976) sugeriram que extratos de luciferina de *P. pellucens* adultos, alimentados com L-¹⁴C-cistina possuem um composto identificado como sendo idêntico à luciferina de vagalumes.

A diversidade das cores da bioluminescência observada para ovos, larvas, pupas e adultos (protórax e abdômen) de um dado elaterídeo luminescente, pode ser resultado de: (1) distintos microambientes nos fotócitos em termos de pH, força iônica, natureza e concentração dos cátions divalentes, que como é sabido, podem modular a cor da emissão de luz promovendo mudanças conformacionais na luciferase (Hastings e Wilson, 1976 e

referências citadas); (2) presença de filtros no fotócito; (3) filtração externa pelas camadas de quitina ou, (4) existência de isoenzimas distintas de luciferase para cada estágio de metamorfose e no órgão luminescente do tórax e abdomen dos adultos. Os argumentos (1) e (2) não parecem prováveis pois em condições-padrão os extratos de lanternas de abdômen e de protórax das várias espécies continuaria a emitir luz com diferenças entre 4 a 22 nm no pico de emissão (exceto *H. ignifer*) e as diferenças observadas dos picos medidos "in vivo" de *P. termitilluminans* em vários estágios são mantidas quando elas são medidas "in vitro" (Tabela 7). Adicionando-se extrato do órgão luminescente abdominal denaturado de *P. divergens* no extrato protorácico contendo luciferase ativa dissolvida na mistura de reação, ou "vice-versa", não há alteração significativa no espectro de bioluminescência correspondente ao extrato ativo sozinho (Figura 11). O argumento (3) poderia explicar porque a distribuição espectral obtida "in vivo" e "in vitro" são ligeiramente diferentes (0 - 9 nm) para Pyrophorini e diferentes de 12 nm (protórax) e 29 nm (abdomen) de *H. ignifer*, mas não as diferenças observadas entre os valores obtidos para os extratos provenientes do protórax e abdomen. As grandes diferenças das cores observadas para "in vivo" e "in vitro" Hapsodrilini e Pyrophorini podem ser atribuídas ao fato de que o segmento torácico é mais escuro para o primeiro.

A existência de isozimas de luciferase nas lanternas

abdominais e protoráxica é sugerida pelo fato de que o espectro de emissão obtido de misturas de extratos ativos de luciferase abdominal e toráxica corresponde grosseiramente à soma dos espectros individuais (Figura 12). Strause e DeLuca (1981) demonstraram a possível existência de isoenzimas nos estágios de larva e adulto de *Photinus pyralis* (Lampyridae) e mais recentemente Wienhausen e DeLuca (1985) encontraram, por técnicas imunológicas, que luciferases de adultos de *P.pyralis* e *P.plagiophthalmus* exibem um grande grau de homologia. Em estudos preliminares encontramos que as luciferases de lanternas provenientes de protórax e de abdomen de *P.divergens* apresentam pontos isoelétricos e constantes de Michaelis-Menten para luciferina diferentes (Tabela 8). Estudos mais detalhados sobre essas enzimas e para as luciferases de ovos, larvas, pupas e outros adultos serão encetados posteriormente. O que parece claro é que a bioluminescência dos insetos muda de acordo com o estágio do ciclo de vida em que o animal está e de espécie para espécie.

Devido ao fato de que ovos de *P.termitilluminans* emitem luz continuamente a uma dada temperatura, é possível estimar uma energia de ativação aparente para sua bioluminescência "in vivo" através de projeções de Arrhenius pela intensidade de luz (25 ± 1 kcal/mol; Figura 15). Os diferentes valores de intensidade obtidos para quatro amostras com ca 50 ovos a uma dada temperatura podem ser atribuídos à presença de vários estágios de desenvolvimento embrionário das amostras (algumas amostras possuem "pontos" mais brilhantes que outras) ou

o fato de alguma amostra possuir embriões mortos. Os resultados mostram, entretanto, que todas as amostras aumentam a emissão de luz com pequeno aumento de temperatura. O mesmo tipo de resposta foi observado para larvas de *P.termitilluminans*. Esta dependência sensível da bioluminescência com a temperatura implica que, na natureza, os "cupinzeiros luminescentes" modulam sua luminosidade não somente pela umidade e a hora do dia (Redford, 1982), mas também o calor. Em nossa última expedição ao Parque Nacional das Emas, tornou-se muito claro que a luminescência dos termiteiros varia com a velocidade do vento. Esta sensibilidade à temperatura ambiente pode tornar as larvas aptas a "saber" quando é a ótima ocasião para caçar alados que voam e poder pegá-los. É concebível também dizer que esta alta energia de ativação (25 kcal/mol) não representa a clivagem do dioxetano intermediário no passo de quimioexcitação mas, alguma outra via bioquímica que leve aos reagentes da bioluminescência. Estudos modelos com dioxetanos e dioxetanonas (Horn e col., 1978, 1979; Adam e Ziner, 1982) indicam que os dioxetanos hipotéticos intermediários na reação bioluminescente de vagalumes, tendo um substituinte com muito baixo potencial de oxidação, é clivado via um processo do tipo "chemically initiated electron exchange luminescent" (CIEEL; Koo e col., 1978) e é muito instável, com uma energia de ativação (< 20 kcal/mol) menor que a dos dioxetanos mais simples (> 22 kcal/mol). Uma grosseira estimativa da energia de ativação obtida com extratos brutos preparados a partir dos ovos de *P.termitilluminans* deu ca 16 kcal/mol. Utilizando

luciferase purificada de *Photinus pyralis*, DeLuca (1976) encontrou 9 kcal/mol para a energia aparente de ativação para a reação bioluminescente; nós obtivemos 10 kcal/mol.

Após termos encontrado a mesma luciferina de lampyridae em ovos, larvas, pupas e adultos (protórax e abdomen) de Elateridae (Tabela 6), investigamos o efeito da dose e do tempo de incorporação de cistina marcada na sua molécula. As manchas fluorescentes devido à presença de luciferina marcada biossintetizada, foram reveladas nas placas de sílica-gel por incidência de raios-UV (fluorescência azul esverdeada, com a mesma migração relativa da luciferina de "vagalumes") e autoradiografia.

Pode-se observar uma resposta linear da luciferina sintetizada pela larva de *P.termitilluminans* à dose do precursor radiativo (Figura 6a, b, e c). Interessante que a curva temporal do rendimento radioquímico (Figura 7) é bastante similar aquela obtida por Okada e col. (1974), quando alimentaram insetos adultos de Lampyridae, ou com oxiluciferina ou 2-ciano-6-hidroxibenzotiazol, possíveis intermediários hipotéticos, na via biossintética da luciferina. Isto pode significar que o passo limite da biossíntese dessa molécula, em lampirídeos ou elaterídeos luminescentes é posterior à incorporação da primeira cistina na quinona (Prosta e Ponsiglione, 1972; McCapra e Razavi, 1976). O esquema seguinte mostra os possíveis passos da incorporação dos precursores radiativos na molécula de luciferina.

A cromatografia do extrato dos 9-100 segmentos abdominais das larvas de *P. termitilluminans*, que também possuem intensa luminescência, mostrou em todos os experimentos, o aparecimento de vários componentes com radioatividade. Foi bastante difícil a quantificação do pico da luciferina radiativa, apesar do aparecimento da mancha fluorescente. Provavelmente a ocorrência destes picos é devida à presença de vários intermediários da biossíntese da luciferina ou mesmo produtos de metabolização normal da cistina (por exemplo, peptídeos ou mesmo outros compostos nitrogenados ou carboxilados).

4.3. Metabolismo radicalar do oxigênio:

4.3.1. Resultados.

A Figura 19 e a Figura 20 mostram a distribuição das atividades de catalase e SOD, respectivamente, encontradas em representantes das famílias Elateridae, Lampyridae, Phengodidae, Ptiladactilidae e Tenebrionidae.

A Tabela 9 resume as atividades de SOD e catalase em extratos brutos de larvas de Elateridae luminescentes e não-luminescentes (*P.bicinctus*, *C.zonatus*, *Ischiodontus* sp. e *Conoderus* sp.) bem como em larvas de Lampyridae (*Bicellonycha* sp) e Phengodidae. Com respeito aos elaterídeos, somente o *Ischiodontus* sp não pertence à sub-família Pyrophorinae. Para comparação, dados correspondentes a outros coleópteros não-luminescentes (Ptiladactilidae e Tenebrionidae) foram também incluídos na Tabela 9.

A Figura 21 mostra esquematicamente uma larva de *P.termitilluminans* (cabeça, pró-, meso- e metatórax e último segmento abdominal) e as atividade de SOD e catalase encontradas em cada uma dessas partes. O protórax e os últimos segmentos emitem mais intensamente que os outros segmentos. Para comparação, estas enzimas foram também ensaiadas em extratos preparados de um Pyrophorinae não-luminescente *C.zonatus*; n=3): tórax ($\bar{X}_{SOD} = 2,8 \pm 0,6$ U/mg proteínas; $\bar{X}_{catalase} = 11 \pm 2$ mU/mg proteína), e abdomen ($\bar{X}_{SOD} = 2,9 \pm 0,6$ U/mg proteínas; $\bar{X}_{catalase} = 12,2 \pm 0,4$ mU/mg proteína).

Figura 19. Distribuição das atividades de catalase em
 a) *P.divergens*, b) espécie luminescente não identificada de
 Elateridae, c) *P.termitilluminans*, d) Lampyridae,
 e) Phengodidae, f) elaterídeos não-luminescentes: *Conoderus* sp
P.bicinctus, *Ischiodontus* sp. e *C.zonatus* g)
Ptilodactilidae, h) Tenebrionidae.

Figura 20. Distribuição atividades de SOD em a) *P.divergens*, b) espécie luminescente não identificada de Elateridae, c) *P.termitilluminans*, d) Lampyridae, e) Phengodidae, f) elaterideos não luminescentes: *P.bicinctus*, *C.zonatus*, *Ischiodontus* sp. e *Conoderus* sp. , g) Ptilodactilidae, h) Tenebrionidae.

Tabela 9. Atividade de superóxido dismutase em larva de Coleoptera*.

Família	Espécies	Luminescence	n	$\bar{X}$ SOD (U/mg protein)	$\bar{X}$ catalase (mU/mg proteína)
Elateridae	<i>Pyrophorus divergens</i>	+	18	8 ± 2	22 ± 4
	An unidentified <i>Pyrophorini</i>	+	6	9 ± 1	42 ± 6
	<i>Pyrearinus termitilluminae</i>	+	10	28 ± 3	10 ± 3
	<i>Platycnepidus bicinctus</i>	-	1	1.3	10
	<i>Chalcolepidus zonatus</i>	-	4	1.4 ± 0.4	12 ± 1
	<i>Ischiodontus</i> sp.	-	6	1.8 ± 0.5	15 ± 4
	<i>Conoderus</i> sp.	-	11	2.5 ± 0.9	14 ± 4
Lampyridae	<i>Bicellonychia</i> sp.	+	4	11 ± 1	1.3 ± 0.1
Phengodidae	<i>Phengodes</i> sp.	+	11	26 ± 5	5 ± 2
Ptilodactylidae	<i>Ptilodactyla</i> sp.	-	2	11 ± 2	30 ± 2
Tenebrionidae	<i>Palearbus dextroideus</i>	-	6	11 ± 3	21 ± 1

*

São dados os valores médios e os desvios padrão das medidas. As atividades foram obtidas de acordo com a metodologia descrita em Materials e Métodos. Para a determinação da concentração de proteínas utilizou-se o método de Biureto e medida de absorbância em 280 nm.

Figura 21. Atividades de SOD e Catalase encontradas nos diversos segmentos do corpo das larvas de *P.termitilluminans* (n = 8) e *C. zonatus* (n = 4).

Segmento do corpo	<u>P.termitilluminans</u>		<u>C.zonatus</u>	
	-	-	-	-
	X SOD (U/mg)	X CAT (mU/mg)	X SOD (U/mg)	X CAT (mU/mg)
A-Protórax	39 + 8	7 + 2		
			3 + 0,5	10 + 2
B-Meso- Meta tórax	24 + 7	7 + 2		
C-1-80 seg. abdominal	20 + 6	6 + 1		
			6 + 1	12 + 0,3
D-9-100 seg. abdominal	34 + 5	5 + 3		

Adições de luciferina sintética de vagalumes (10^{-6} -
- 10^{-4} M) nos ensaios de SOD não alteram as medidas de atividade
dessa enzima.

A Figura 22 e a Tabela 10 mostram a distribuição das
atividades de succinato desidrogenase encontrada nas diversas
partes do corpo de larvas da tribo Pyrophorinae
(*P.termitilluminans*, n = 4; *P.divergens*, n = 3 e
C.zonatus, n = 4).

Figura 22. Distribuição de atividade de Succinato Desidrogenase nas distintas partes do corpo das larvas de espécies de Pyrophorinae.

Tabela 10. Resumo das atividades de Succinato desidrogenase encontrada nos segmentos das larvas de Elateridae *

Espécies	n	Protórax	Neso + metotórax	1-80 segmento abdomen	9-100 segmento abdomen
<i>Pyrophorus divergens</i>	3	0.86 ± 0.09	0.67 ± 0.09	1.10 ± 0.15	0.64 ± 0.12
<i>Pyrearinus tenuitelluminans</i>	4	0.49 ± 0.09	0.15 ± 0.07	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.05
<i>Chalcobipidus zonatus</i>	4	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.04	0.22 ± 0.09	0.13 ± 0.03

* Os valores encontrados estão representados por mU/mg proteína. A concentração de proteínas foi calculada utilizando-se o método de coloração com Comassie-blue utilizando-se a ovalbumina como padrão.

4.3.2. Discussão.

A Tabela 9 mostra que larvas de elaterídeos luminescentes e não luminescentes diferem sensivelmente com respeito à concentração de SOD e catalase. É tentador especular que os níveis mais altos de SOD encontrados em larvas de *P. divergens* e da espécie não identificada de Pyrophorinae (x 5 a x 15, respectivamente), quando comparados àqueles de elaterídeos não luminescentes, seja consequência da necessidade de estocagem de altas concentrações de oxigênio nos seus fotóferos para sustentar a reação bioluminescente, tornando-os mais susceptíveis a danos causados pelas espécies ativas de oxigênio. Uma direta correlação entre bioluminescência e "toxicidade de oxigênio" é, sem dúvida, fortemente sugerida pelo fato de que as partes mais brilhantes (protórax e os dois últimos segmentos abdominais) de larvas de *P. termitilluminans* exibem maiores (2 vezes) níveis de SOD (Figura 21). Em contraste, larvas não luminescentes (*C. zonatus*) pertencentes à mesma sub-família mostram atividades similares de SOD em seu tórax e abdomen.

Outro aspecto interessante dos dados de SOD relatados aqui (Figura 19 e Tabela 9) para os elaterídeos luminescentes, é a relação entre os níveis de SOD e a disponibilidade de oxigênio existente no habitat do inseto. Larvas de *P. termitilluminans*, que vivem em galerias aeradas apresentam maior atividade de SOD (5 vezes) que *P. divergens*

e a espécie de Pyrophorinae não identificada, as quais vivem em galerias escavadas em troncos de árvores em fase de apodrecimento, onde a tensão efetiva de oxigênio é menor que 2% (Crowson, 1981) e de CO₂ maior que 21%. Neste caso, entretanto, um maior nível de SOD mitocondrial (Mn-dependente) contida em *P.termitilluminans* em relação às outras duas outras espécies, poderia resultar de uma maior intensidade da atividade respiratória. Porém, os resultados da dosagem de succinato desidrogenase no *P.termitilluminans* (Figura 22 e Tabela 10) sugerem que, apesar de o protórax apresentar uma maior densidade de mitocôndrias (ou de superfície de cristas), os 9-10^o segmentos abdominais possuem praticamente os mesmos níveis de atividade mitocondrial que nas outras partes e aqueles encontrados em *C.zonatus*. Provavelmente a natureza do SOD medida nos órgãos luminescentes desses insetos seja, assim, predominantemente extramitocondrial (Cu-Zn-dependente). Esses resultados podem fortalecer a hipótese de que os níveis de SOD são dependentes diretamente da pressão de oxigênio, como demonstrado em microorganismos facultativos (Hassan e Fridovich, 1977) e ratos (McLenan e Autor, 1982) expostos a aumentos parciais da pressão de oxigênio.

Parece-nos claro que os elaterídeos luminescentes estudados aqui, de alguma maneira (ou quimicamente ou em organelas especializadas), estocam oxigênio para sustentar a reação luciferina-luciferase. Suficiente dizer que, quando estimuladas com pincéis macios, as larvas emitem luz continuamente por mais

de 30 segundos ao longo de todo o seu corpo (brilhando mais intensamente no protórax); as pupas luminescem por muito mais tempo (minutos). Adultos de *P. divergens* luminescem durante horas sob pressão reduzida em presença de pentóxido de fósforo; neste tempo, a cor da emissão de luz muda gradualmente do verde para o vermelho.

Com respeito aos níveis de catalase, nossos dados definem três grupos distintos de Pyrophorinae: (i) *P. divergens*, caracterizado por apresentar ca 70% a mais de atividade de catalase que os Elateridae não luminescentes; (ii) a espécie não identificada de Elateridae, com a catalase triplicada e (iii) *P. termitilluminaans* com ca 30% a menos de atividade. Estes dados porém, não tornam claro se a catalase atua como mecanismo de proteção enzimática secundária contra altos níveis de peróxido de hidrogênio formado durante a dismutação do íon superóxido, ou como um mecanismo de estocagem de oxigênio como foi sugerido por Hanna e col. (1976) para o caso de Lampyridae.

Que SOD e catalase, juntos com vários outros constituintes da hemolinfa (glicerol, sorbitol, carotenóides; Crowson, 1981; Chapman, 1974) podem prevenir os efeitos tóxicos do oxigênio ativado é plausível em termos de literatura (Chance e col., 1979; Fridovich, 1982; Foote, 1982). Mais intrigante e pobremente explorado é o mecanismo pelo qual larvas estocam oxigênio molecular. Nestes termos, as maiores possibilidades incluem: oxigênio dissolvido na hemolinfa, retenção de oxigênio

em sacos respiratórios, presença de oxisomas (?) nos fotócitos, peróxido de oxigênio, hidroperóxido, endoperóxidos e oximetalo-proteínas.

Baseados em (i) a existência de três grupos de Pyrophorinae luminescentes com respeito aos níveis de catalase, um deles (*P. termitilluminans*) mais pobre em catalase que os não-luminescentes (Tabela 9 , Figura 20) e (ii) o fato que as atividades de catalase são aproximadamente as mesmas nos segmentos torácico e abdominal do corpo da larva luminescente e são independentes da intensidade de emissão (Figura 21), pode-se inferir que peróxido de hidrogênio não funciona como a fonte principal de oxigênio. De fato, seria surpreendente se a natureza tivesse selecionado o peróxido de hidrogênio como fonte de O_2 , dado que é muito bem documentada sua toxicidade em presença de complexos e traços de metais de transição (Ulrich, 1983). O mesmo poderia ser verdade para hidroperóxidos orgânicos e endoperóxidos (Foote, 1982).

Retenção física do oxigênio em "sacos de ar" (extensões da traquea) pode também ser descartada pois estes tipos de estruturas estão ausentes em larvas e adultos de Pyrophorinae (Crowson, 1981); embora os segmentos abdominais e protorácico de *P. termitilluminans* emitam luz intensamente. Case e Dubois (1978), discutindo os aspectos da bioluminescência em Lampyridae, mencionam que " não há evidências à mão com respeito aos níveis de oxigênio em fotóferos de adultos e larvas". A diferença observada entre os níveis de SOD em Elateridae luminescentes e

não-luminescentes e a observação da emissão de luz contínua por horas pelos Pyrophorinae mantidos sob pressão reduzida leva-nos a crer que a bioluminescência não depende somente do oxigênio dissolvido na hemolinfa.

A hipótese mais atrativa é que o oxigênio é estocado em organelas especializadas ou na forma de complexos de oximetalo proteínas, apesar de que Crowson (1981) relatou que ainda não foram descritas proteínas carreadoras de oxigênio em nenhum Coleóptero adulto ou larva.

Finalmente, não é surpresa que larvas de insetos pertencentes a outras famílias (Tabela 9) exibem larga distribuição de atividades de catalase e SOD, já que isto também acontece com organismos superiores (Maral e col., 1977; Marklund e col., 1982). Se níveis de SOD, catalase e (talvez) glutational peroxidase de insetos têm algum significado taxonômico, isto poderá ser respondido somente por uma pesquisa ampla de medidas dessas enzimas em um número maior de espécies de insetos.

4.4. Enzimas Digestivas.

4.4.1. Resultados.

4.4.1.1 pH do conteúdo do tubo digestivo e do material regurgitado

Tanto o material regurgitado pelas três espécies como o conteúdo fluido do tubo digestivo apresentam um valor de pH neutro ($7,3 \pm 0,1$, $n=3$). E todos parecem estar eficientemente tamponados pois, após terem sido diluídos aproximadamente 10 vezes com água bidestilada, os valores de pH foram alterados de apenas 0,2 unidades. Também não houve significativa perda de atividade das enzimas, após estocagem dos regurgitados no "freezer" e descongelamento por várias vezes, durante algumas semanas.

4.4.1.2 ótimos de pH

Todos os ensaios foram realizados como indicado na tabela 4. A Figura 23 exemplifica a variação da atividade da aminopeptidase com diferentes tampões para o regurgitado de *P. termitilluminans*. Todas as outras enzimas respondem linearmente quanto à atividade catalítica nos tempos de incubação utilizados. As regressões lineares dessas curvas fornece-nos a atividade enzimática, e sua relação com a concentração proteica dá-nos a atividade específica. A Figura 24 resume as curvas de atividade das enzimas presentes no regurgitado dos insetos de *P. termitilluminans*,

Figura 23. Variação temporal da atividade de aminopeptidase encontrada no regurgitado de larvas de *P. termitilluminans*.

Figura 24. Curvas de pH encontrado para as enzimas digestivas presentes nos regurgitados dos insetos da família Elateridae.

P.divergens, e do espécie de Elateridae não identificado, relacionados com o pH de incubação.

4.4.1.3 Atividade específica e distribuição das hidrolases nas regiões do tubo digestivo

Inicialmente, após recolhermos os regurgitados de *P.termitilluminans*, *P.divergens* e da espécie de Elateridae não identificada fizemos medidas de atividade específica das enzimas digestivas listadas na Tabela 4, nas condições também citadas. A Tabela 11 resume as atividades específicas determinadas nos regurgitados das larvas de *P.divergens* e da espécie de Elateridae não identificada. Os resultados obtidos de *P.termitilluminans* estão compilados na Tabela 13, a qual também traz as atividades das enzimas digestivas presentes no fluído do interior do tubo digestivo e nas suas células. Pode-se observar pela Tabela 12 que a maior atividade das enzimas é encontrada no meio do tubo digestivo do *P.termitilluminans*.

Como controle foi medido a atividade das enzimas digestivas no alimento das larvas (ração comercial de gatos) e na porção posterior do tubo digestivo. Os resultados mostraram valores de atividade menores que 2% daqueles encontrados no meio do tubo digestivo.

Tabela 11. Resumo das atividades específicas das enzimas presentes nos regurgitados dos insetos *P. divergens* e de uma espécie não-identificada de Elateridae . As atividades específicas são calculadas através de médias de regressões lineares. Os ensaios estão compilados na Tabela 4 e a concentração total de proteínas foi obtida através do método de Bradford, 1976.

	<i>Pyrophorus divergens</i>	Elateridae não-identificado
	(mU/mg)	(mU/mg)
Tripsina	30,49	57,10
Aminopeptidase	5,40	15,36
Celulase	24,67	27,75
Amilase	308,20	161,09
α -Glicosidase	28,49	112,03
β -Glicosidase	16,25	41,59
Trealase	21,82	197,00
Celobiase	10,13	14,30
Maltase	3,38	20,50

Tabela 12. Atividade de hidrolases (mU/animal) presente em diferentes regiões do tubo digestivo de larvas de *P. temminckii* alimentadas e não-alimentadas.*

Enzima	Alimentadas			Não alimentadas	
	Cabeça	Papo	Tubo digestivo	Tubo digestivo	Tubo digestivo
Aminopectidase	0.5 ± 0.2	8 ± 1	60 ± 6	40 ± 10	
Amilase	10 ± 1	3.4 ± 0.3	64 ± 10	11.3 ± 0.4	
Celulase	0.1 ± 0.1	0.09 ± 0.09	4.5 ± 0.8	0.57 ± 0.08	
α-Glicosidase	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2	16 ± 1	8.5 ± 0.1	
β-Glicosidase	0	0	2.5 ± 0.2	0.94 ± 0.03	
Trealase	4.1 ± 0.5	0.9 ± 0.3	13.9 ± 0.8	8.0 ± 0.2	
Tripsina	0	0.37 ± 0.03	12 ± 1	2.4 ± 0.5	

* Médias e desvios padrão são baseados nas determinações de três preparações independentes obtidos de 10 larvas cada. Animais alimentados são os que apresentam-se de tubo digestivo cheio e os não alimentados de tubo digestivo vazio.

Para os cálculos de atividade específica das enzimas digestivas dos insetos, efetuamos regressões lineares, seguindo o método proposto por Wilkinson (1961).

A Figura 25 traz as curvas de atividade de α -glicosidase e β -glicosidase; presentes aos seus substratos naturais. O regurgitado de *P.termitilluminans*, *P.divergens* e da espécie não identificada de Elateridae contém atividade de maltase (7,69, 10,13 e 20,47 mU/mg, respectivamente) e celobiase (2,93, 3,39 e 14,31 mU/mg, respectivamente).

As cabeças das larvas foram homogeneizadas em conjunto com as glândulas e as partes bucais, devido à dificuldade de dissecação destas glândulas. Com excessão da amilase e trealase, as atividades das outras hidrolases encontradas foi inferior a 2% dos valores correspondentes determinados no meio do tubo digestivo (Tabela 12). A alta atividade de trealase encontrada nos homogeneizados da cabeça é provavelmente devido aos corpos graxos cefálicos, entretanto a amilase pode ser derivada das glândulas que funcionam como glândulas salivares. As migrações eletroforéticas (5 a 7% de concentração de geis de poliacrilamida) da amilase da cabeça e do meio do tubo digestivo são idênticas.

Parece não haver ativadores ou inibidores nas células e no conteúdo fluído do tubo digestivo que afetem a atividade das enzimas digestivas de *P.termitilluminans*, pois nos ensaios em separado e acrescentando células e fluído do tubo digestivo, não houve alteração na atividade específica total.

Figura 25. Curvas de atividade de α -Glicosidase (A) em Tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 7,0 e β -Glicosidase (B) em Tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 6,0, perante seus substratos naturais maltose e celobiose, respectivamente. A maltase e celobiase foram ensaiadas nos regurgitados de *P. divergens* (-○-); *P. termitillum* (-□-) e da espécie luminescente não identificada de Elateridae (-■-).

Amilase, celulase, β -glicosidase e tripsina são encontradas em maiores quantidades no lúmen do meio do tubo digestivo (Tabela 13) e na fração solúvel das células do tubo digestivo (Tabela 14). Aminopeptidase, α -glicosidase e trealase ocorrem preferencialmente nas células do meio do tubo digestivo (Tabela 13), parte como enzima solúvel e parte como enzima ligada à membrana (Tabela 14). Com exceção da tripsina, que predomina nas células anteriores do meio do tubo digestivo, todas as outras distribuem-se ao longo dele (Tabela 13).

Tanto a atividade total (por animal) como a atividade específica das enzimas do regurgitado e do conteúdo fluído de larvas de *P. termitillum* são similares (Tabela 13). Portanto, parece que a larva está apta a injetar o seu fluído contido no tubo digestivo em suas presas.

4.4.1.4. Efeito do jejum nas enzimas digestivas

As enzimas digestivas são mais ativas em animais alimentados (Tabela 12). Amilase, celulase e tripsina são de 5 a 8 vezes mais ativas, β -glicosidase, aproximadamente 3 e aminopeptidase, α -glicosidase e trealase são somente 1,5 a 2 vezes mais ativas em animais alimentados.

Tabela 13. Hidrolases presentes nas células do tubo digestivo, no conteúdo fluído do tubo digestivo e no material regurgitado de larvas de alimentados de *P. temitielluminans* ^{*}.

	Células do tubo digestivo			Conteúdo Fluído do tubo digestivo	Material Regurgitado
	Anterior	Posterior			
Aminopeptidase	38 ± 4 (240 ± 60)	35 ± 4 (250 ± 60)	14 ± 2 (70 ± 20)	13 ± 4 (50 ± 10)	
Amilase	14 ± 2 (80 ± 7)	18.0 ± 0.5 (110 ± 30)	63 ± 10 (238 ± 2)	64 ± 10 (220 ± 30)	
Celulase	21 ± 4 (8 ± 1)	20 ± 2 (10 ± 1)	57 ± 9 (14 ± 4)	53 ± 10 (13.6 ± 0.6)	
α-Glicosidase	32 ± 1 (54 ± 5)	29 ± 1 (50 ± 7)	35 ± 6 (46 ± 6)	36 ± 10 (30 ± 5)	
β-Glicosidase	15 ± 3 (3.2 ± 0.4)	10 ± 2 (2.7 ± 0.6)	75 ± 4 (15 ± 4)	110 ± 5 (17 ± 3)	
Trealase	40 ± 3 (58 ± 8)	36 ± 5 (59 ± 3)	17 ± 4 (25 ± 6)	9 ± 2 (18 ± 2)	
Tripsina	8.2 ± 0.1 (11 ± 2)	3.8 ± 0.2 (5 ± 1)	85 ± 10 (110 ± 10)	107 ± 7 (105 ± 4)	

^{*} Os resultados são mostrados como porcentagens da soma das atividades encontradas na cabeça, papo e tubo digestivo e a atividade específica (em parênteses) está expressada em mU/mg proteína. O material regurgitado foi coletado em papel absorvente após serem atacados pelas larvas. Nenhuma atividade de celulase foi encontrada (nível detecção: 0,01 mU/animal) no papel utilizado para a coleta do regurgitado. Médias e desvios padrão são baseados nas determinações obtidas em três diferentes preparações obtidas de 10 larvas cada.

Tabela 14. Hidrolases nas frações solúveis das células de
 duas diferentes regiões do tubo digestivo ^{*}.

Enzima	Regiões do tubo digestivo	
	Anterior	Posterior
Aminopeptidase	67 ± 6	49 ± 9
Amilase	100 ± 0	100 ± 0
Celulose	100 ± 0	100 ± 0
α-Glicosidase	64 ± 10	66 ± 10
β-Glicosidase	100 ± 0	100 ± 0
Trealase	37 ± 5	38 ± 7
Tripsina	100 ± 0	100 ± 0

*

Os resultados são as porcentagens das somas de parte solúvel mais as atividades enzimáticas das ligadas às membranas. Os valores e os desvios representam as médias de 2 preparações independentes de 10 animais cada.

4.4.1.5. Propriedades físico-químicas das enzimas digestivas

Os experimentos de migração eletroforética em géis de poliacrilamida, foram feitos como está descrito no item 2.23. As atividades das enzimas presentes no regurgitado e fluído luminal das larvas são determinadas seguindo os ensaios como mostrado na Tabela 4. A figura 26 mostra os perfís das eletroforeses realizadas para os regurgitados de *P.termitilluminans*, *P.divergens* e da espécie de Elateridae não identificada. Com excessão da tripsina de todos os insetos e da aminopeptidase e β -glicosidase de *P.divergens* e da β -glicosidase de a espécie de Elateridae não identificada, todas as enzimas ensaiadas mostram exclusivamente um pico de atividade enzimática.

Todos os experimentos de determinação de peso molecular foram realizados como está descrito no item 2.25. A Figura 27 mostra as curvas de atividade enzimática obtidas em gradientes de glicerol. As curvas foram obtidas medindo-se atividades enzimáticas retirando-se alíquotas (0,2 ml) do fundo do tubo de centrífuga. Comparou-se a região de máxima atividade com a fração na qual estava presente o marcador (catalase, PM=232.000 e hemoglobina, PM= 64.000). Apenas a β -glicosidase de espécie de Elateridae não identificada, apresentou dois picos de atividade, mostrado no perfil de dupla atividade da Figura 27 Todas as demais enzimas mostraram apenas um máximo de atividade.

Figura 26. Perfís de eletroforese das enzimas digestivas: (A) Tripsina, (B) Aminopeptidase, (C) Celulase (D) Amilase, (E) α -Glicosidase, (F) β -Glicosidase, (G) Trealase presentes no regurgitado de *P.termitilluminans* (-•-), *P.divergens* (-●-) e da espécie não identificada de Elateridae (-○-). O símbolo (-○-) representa frações com 2 ou 3 absorbâncias iguais

Figura 27. Perfís de sedimentação em gradientes contínuos de glicerol. As frações (0,2 ml) foram coletadas a partir do fundo do tubo. As condições dos ensaios enzimáticos estão compiladas na tabela 4. Os marcadores de peso molecular utilizados são: CAT, Catalase de fígado bovino (PM; 232.000), Hb, Hemoglobina bovina (PM, 64.000). enzimas digestivas ensaiadas: (A), trealase, (B) Aminopeptidase, (C) Tripsina, (D) α -Glicosidase, (E) Amilase, (F) β -Glicosidase, (G) Celulase de *P.termitilluminans* (—•—), *P.divergens* (—●—), (—○—) da espécie não identificada de Elateridae. O símbolo (—●—) representa frações com duas ou três espécies com mesma absorbância.

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) das enzimas que apresentaram atividades digestivas no regurgitado dos insetos luminescentes estudados, variamos as concentrações dos substratos no seu melhor tampão de atividade, como está melhor descrito no item 2.26. A figura 29 exemplifica a linearidade das curvas obtidas, e cálculos de regressão linear ponderada (Wilkinson, 1961) das projeções de Lineweaver-Burck fornecem os K_m . As Tabelas 15 e 16 resumem os parâmetros físico-químicos calculados para as enzimas do regurgitado das larvas da espécie de Elateridae não identificada e *P. divergens*, respectivamente.

Quanto aos ensaios com larvas de *P. termitilluminans* pode-se observar que, em géis de poliacrilamida, tanto o regurgitado quanto o fluído luminal extraído apresentaram claramente três atividades de tripsina. Desde que há somente uma atividade de tripsina encontrada no gradiente de sedimentação de densidade de glicerol, como uma proteína de PM de 39.000 (Figura 27, Tabela 17), é possível que as tripsinas diferentes encontradas possam ser formas isoméricas desta enzima. Outra evidência deste fato é que a tripsina de *P. termitilluminans* apresentou três diferentes pontos isoelétricos (Figura 28 e Tabela 17). Desde que BAPA é uma mistura de isômeros D e L, o K_m encontrado poderia ser incorreto. Entretanto as projeções de duplo-recíproco destas enzimas são retilíneas, sugerindo que D-BAPA não é inibitória (pelo menos nas concentrações usadas), sugerindo assim que o valor de K_m determinado é o verdadeiro. As tripsinas para a espécie de

Figura 28. Perfís da atividade enzimática digestiva presentes em géis que continham anfolitos para a determinação do pI. As enzimas (A) Trealase, (B) Aminopeptidase, (C) Tripsina, (D) β -Glicosidase, (E) α -Glicosidase e (F) Amilase de *P.termitillum* (---), *P.divergens* (-●-) e da espécie de Elateridae não identificada (-○-) foram ensaiadas (Tabela 4). O simbolo (-●-) representa frações com duas ou três espécies com a mesma absorbância. A curva representada acima da figura foi construida medindo-se o pH das frações do gel padrão sem a presença das enzimas digestivas.

Elateridae não identificada e *P.divergens* apresentam também duas atividades nas eletroforeses em géis de poliacrilamida (Figura 26 e Tabelas 15 e 16, respectivamente) e dois valores de pI para a espécie de Elateridae não identificada e três de pI para *P.divergens* (Figura 28 e Tabelas 15 e 16, respectivamente). A Figura 29 exemplifica as curvas obtidas para o calculo de Km da α -glicosidase presente no regurgitado dos insetos. Todas as outras enzimas ensaiadas neste capítulo da tese mostraram linearidade nos intervalos de concentração de substrato utilizado.

Há somente uma espécie molecular de aminopeptidase, amilase, celulase, α -glicosidase, β -glicosidase e trealase no fluído luminal e no regurgitado de larvas de *P.termitilluminans* como foi revelado por eletroforese em gel de poliacrilamida, isoeletrofocalização e gradiente de densidade gerado por centrifugação. Os valores de Km e outras propriedades das enzimas digestivas de *P.termitilluminans* são dadas na Tabela 17.

Figura 29. Duplo-Recíproco das atividades de α -Glicosidase encontrada nos regurgitados dos Elaterídeos versus concentração de substrato.

Tabela 15. Propriedades físico-químicas de algumas hidrolases solúveis presentes no regurgitato das larvas de espécie não identificada de Elateridae .

Enzimas	K _M (mM)	Migração eletroforética	pI	P.M.	Diâmetro das enzimas hidratadas (nm)
Aminopeptidase	0.85 ± 0.02	0.39	5.7	108.000 ± 6.000	7.8
Amilase	0.11 ± 0.013	--	6.2	---	---
Celulase	1.05 ± 0.143	0.63	---	64.000 ± 4.000	6.8
α-Glicosidase	2.63 ± 0.18	0.53	5.2	72.000 ± 4.000	7.1
β-Glicosidase	0.37 ± 0.07	0.28; 0.40	5.2	---	---
Trealase	0.47 ± 0.05	0.45	7.2	64.000 ± 4.000	6.8
Tripsina	0.55 ± 0.01	0.28	---	28.000 ± 2.000	4.9

* Os valores de pH e pI foram determinados como descrito em Materiais e Métodos. Os valores de K_M (média ± desvio padrão, n = 10) foram determinados por regressão linear ponderada (Wilkinson 1961) usando um programa em Basic (Oestreicher e Pinto, 1983). As migrações eletroforéticas são migrações das enzimas ativas em géis de poliacrilamida em relação à corrida do corante. Os valores de P.M. (são pesos moleculares relativos) foram calculados por dados de ultracentrifugação (Martin e Ames, 1961) e correspondem a média (baseados em duas determinações). Os diâmetros das enzimas hidratadas foram interpoladas numa projeção de log (P.M.) vs raio de Stoke usado para 11 proteínas (detalhes em Terra e Ferreira, 1983).

Tabela 16. Propriedades físico-químicas de algumas hidrolases solúveis presentes no regurgitado de larvas de *P. divengens*.

Enzimas	K _M (mM)	Migração Eletróforética	pI	P.M.	Diâmetro das enzimas hidratadas (nm)
Aminopeptidase	0.75 ± 0.02	0.35	5.4; 6.6	115.000 ± 7.000	8.2
Amilase	0.15 ± 0.01*	--	--	---	---
Celulase	0.75 ± 0.09*	0.57	--	58.000 ± 4.000	6.6
α-Glicosidase	1.57 ± 0.09	0.51	5.4	75.000 ± 5.000	7.2
β-Glicosidase	0.26 ± 0.04	0.28; 0.35	6.0; 6.6	82.000 ± 5.000	7.5
Trealase	1.06 ± 0.12	0.47	6.1	67.000 ± 4.000	6.8
Tripsina	0.55 ± 0.03	0.27; 0.95	4.2; 6.0; 6.6	24.000 ± 1.000	4.7

+ Os valores de pH e pI foram determinados como descrito em Materiais e Métodos. Os valores de K_M (média ± desvio padrão, n = 10) foram determinados por regressão linear ponderada (Wilkinson, 1961) usando um programa em Basic (Oestreicher e Pinto, 1983). As migrações eletroforéticas são migrações das enzimas ativas em géis de poliacrilamida em relação à corrida do corante. Os valores de P.M. (são pesos moleculares relativos) foram calculados por dados de ultracentrifugação (Martin e Ames, 1961) e correspondem a média (baseados em duas determinações). Os diâmetros das enzimas hidratadas foram interpoladas numa projeção de log (P.M.) vs raio de Stoke usado para 11 proteínas (detalhes em Terra e Ferreira, 1983).

Tabela 17. Propriedades físico-químicas de algumas hidrolases solúveis de larvas de *P. temitellum*.⁺

Enzimas	K _M (mM)	Migração Eletrorofética	pI	P.M.	Diâmetro das enzimas hidratadas (nm)
Aminopectidase	0.60 ± 0.06	0.29	5.7	108.000 ± 7.000	8.2
Amilase	0.42 ± 0.04	0.25	6.2	64.000 ± 4.000	6.8
Celulase	1.3 ± 0.2	0.60	---	58.000 ± 3.000	6.6
α-Glicosidase	3.5 ± 0.2	0.60	5.2	79.000 ± 5.000	7.3
β-Glicosidase	0.39 ± 0.05	0.38	5.2	110.000 ± 6.000	8.0
Trealase	0.75 ± 0.09	0.53	7.2	110.000 ± 6.000	8.0
Tripsina	0.70 ± 0.04	0.33; 0.63; 0.85	4.6; 6.0; 6.7	39.000 ± 2.000	5.7

⁺ Os valores de pI e pI foram determinados como descrito em Materiais e Métodos. Os valores de K_M (média ± desvio padrão, n = 10) foram determinados por regressão linear ponderada (Wilkinson 1961) usando um programa em Basic (Oestreicher e Pinto, 1983). As migrações eletroforéticas são migrações das enzimas ativas em géis de poliacrilamida em relação à corrida do corante. Os valores de P.M. (são pesos moleculares relativos) foram calculados por dados de ultracentrifugação (Martin e Ames, 1961) e correspondem a média (baseados em duas determinações). Os diâmetros das enzimas hidratadas foram interpoladas numa projeção de log (P.M.) vs raio de Stoke usado para 11 proteínas (detalhes em Terra e Ferreira, 1983).

4.4.2. Discussão:

Mapeamento das Enzimas Digestivas no Tubo Digestivo de *P.termitilluminans*

As enzimas digestivas estão ausentes no alimento de *P.termitilluminans* e a quantidade encontrada no intestino posterior e no papo é insignificante. Nenhum ativador ou inibidor que afetasse as atividades das enzimas digestivas foi encontrado nas células do tubo digestivo ou no fluído luminal. Portanto, todo o processo digestivo deve ocorrer sob a ação das hidrolases encontradas no tubo digestivo e glândulas associadas com partes da boca do inseto.

Aproximadamente 15% da atividade total de amilase encontrada nas larvas de *P.termitilluminans* está presente nos homogeneizados da cabeça. Desde que a amilase proveniente da cabeça é eletroforeticamente idêntica à amilase do tubo digestivo, é possível que toda a amilase do tubo digestivo seja derivada de glândulas da boca da larva, talvez glândulas mandibulares, pois glândulas labiais estão ausentes nos Coleoptera (Snodgrass, 1935), atuando como glândulas salivares. A amilase ensaiada nas células do tubo digestivo pode corresponder a moléculas de enzima adsorvida na superfície celular.

Aminopectidase e trealase estão, em geral, restritas aos tecidos do tubo digestivo. Isto pode ser constatado pelos dados da Tabela 13, onde se mostra que elas são encontradas em

maior quantidade ligadas ao tubo digestivo. A baixa atividade dessas enzimas encontradas no fluído luminal (e no material regurgitado) pode ser explicada pela descamação celular que é um processo rotineiro em tubos digestivo de Coleoptera (Day e Powning, 1949). A aminopeptidase e trealase associadas às frações de membrana das células (Tabela 4) podem ser comparadas com aminopeptidases de outros insetos (*Rhynchonciara americana*, Ferreira e Terra, 1980; *Erinnyis ello*, Santos e Terra, 1984), ligadas provavelmente à membrana e cobrindo as microvilosidades celulares.

Similarmente à aminopeptidase e trealase, a α -glicosidase ocorre em maiores quantidades nas células do tubo digestivo (parte solúvel e parte ligada à membrana) embora uma quantidade significativa também esteja presente no fluído luminal e também no material regurgitado (Tabela 13 e 14).

Celulase, β -glicosidase e tripsina são provavelmente secretadas no lúmen do tubo digestivo, pois suas atividades específicas são maiores no fluído luminal que nos tecidos do tubo digestivo (Tabela 13).

A alimentação tem um efeito marcante na ativação de amilase, celulase e tripsina presentes no tubo digestivo de *P. termitilluminans* (Tabela 12). Estes resultados são similares aos encontrados para outros predadores e em insetos hematófagos, nos quais a secreção enzimática (estudos detalhados existem somente para proteinases) ocorre como resposta associada ao alimento ingerido (Gooding, 1975; Garcia e Garcia, 1977).

Entretanto, algumas enzimas parecem conservar sua ocorrência em *P.termitilluminans*, desde que as enzimas envolvidas na digestão terminal estão principalmente ligados às células (com excessão de β -glicosidase) e provavelmente, por esta razão elas não perdem quantidades substanciais durante o jejum (Tabela 12 e 13).

Organização espacial da digestão de larvas de *P.termitilluminans*

Devido ao fato de que insetos que mantêm digestão pré-oral necessitam de uma membrana peritrófica (Wigglesworth, 1972), Carabidae (Waterhouse, 1953; Cheeseman e Pritchard, 1984b) os Elateridae (pelo menos larvas de *P.termitilluminans*, segundo comunicação pessoal de Terra e col.) também a possuem. Desde que o diâmetro das moléculas das enzimas digestivas de *P.termitilluminans*, as quais foram encontradas no fluído luminal do tubo digestivo, são iguais ou menores que 8,0 nm (Tabela 17), é possível que os poros da membrana peritrófica de *P.termitilluminans* tenham diâmetros iguais ou maiores que 8,0 nm (o mesmo pode ser dito para as outras duas espécies; veja tabela 15 e 16). Acredita-se que os poros na membrana peritrófica de larvas de *Sciaridae* sejam entre 7,5 a 8,0 nm de largura (Terra e Ferreira, 1983; Espinoza Fuentes e col., 1984), sendo encontrado valores similares na boca de larvas de *E. ello* (Santos e Terra, 1986).

A comparação entre as atividades das hidrolases encontradas no material regurgitado e no fluído luminal do tubo digestivo (Tabela 13) em *P.termitilluminans*, leva-nos a crer que as larvas desse inseto descarregam todo o seu conteúdo luminal na presa. Exceto β -glicosidase, o material regurgitado é rico essencialmente em hidrolases de polímeros. Isto sugere que o evento principal na digestão pré-oral é quebrar inicialmente o alimento, o qual é então ingerido pela larva, sendo a seguir empacotado na membrana peritrófica do tubo digestivo. Neste local, as hidrolases continuarão hidrolizando as moléculas poliméricas de alimentos até que os oligômeros tornem-se pequenos o suficiente para passar através da membrana peritrófica. Os oligômeros são então hidrolizados para monômeros pelas enzimas (tais como aminopeptidase e α -glicosidase), supondo-se que parte seja associada ao glicocálix e parte ligada à membrana das células ao tubo digestivo. A ocorrência de celulase em larvas predadoras é peculiar; é possível que a celulase seja uma enzima vestigial.

Os dados sobre *P.termitilluminans* não são suficientes para confirmar ou descartar a existência de uma circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas causada por um fluxo de contra corrente do fluído, resultado da secreção de fluídos no meio do tubo intestino posterior e sua absorção no meio do intestino anterior. Esta circulação levaria à conservação das enzimas em contato permanente com o alimento (Terra e Ferreira, 1981; Santos e col., 1983; Terra e col., 1985).

Aspectos Evolucionários das Larvas de Elateridae com
Respeito às Enzimas Digestivas.

Baseados em estudos realizados anteriormente para outras ordens de Coleoptera, Lepdoptera e Diptera, Terra e col. (1985) propuseram que os ancestrais dos Coleopteras, em relação às suas fisiologias digestivas, deviam ter as seguintes características: (a) lúmem do tubo digestivo separado por uma membrana peritrófica em um espaço endoperitrófico e ectoperitrófico, (b) circulação de enzimas digestivas endo-ectoperitrófica causado pela secreção de fluídos no intestino posterior e sua absorção no intestino anterior e, (c) oligômeros (exceto a aminopeptidase, ligada à membrana) e hidrolases são livres e pequenas (menor que 7,5 nm de diâmetro) e podem passar através da membrana peritrófica.

Quanto às informações e aos dados citados acima, podemos especular que os ancestrais de Elateridae diferem dos ancestrais de Coleoptera em relação ao tamanho molecular de algumas hidrolases de dímeros e na imobilização na superfície celular de outras (através de glicocálix e/ou ligação à membrana). Os ancestrais de *Pyrearinus* provavelmente envolvem um ancestral vegetariano (devido à atividade de celulase e β -glicosidase encontrada) e as seguintes características: (a) aumento relativo de atividade de tripsina no fluído luminal que pode ser descarregada na presa, (b) síntese aumentada e secreção de hidrolases em resposta ao alimento, (c) esvaziamento

completo do tubo digestivo após a digestão.

É interessante acrescentar que, devido às postulações para os ancestrais de Elaterídeos (acima) e Tenebrionidae (Terra e col., 1985) pode-se supor que os Elaterídeos possuem, provavelmente, um grau maior de evolução que os Tenebrionidae, o que concorda plenamente com os estudos clássicos (Crowson, 1981).

Fazendo-se uma avaliação comparativa dos dados obtidos das enzimas digestivas nos regurgitados das três espécies de larvas, pode-se notar que as espécies com "habitats" iguais (troncos em fase de apodrecimento) têm maiores similaridades (*P. divergens* e Elateridae não identificado).

As maiores diferenças encontradas na enzimas digestivas de *P. termitilluminans* são: (1) peso molecular da trealase de *P. termitilluminans* (110.000 + 6.000) é ca 2 vezes maior que as trealases das outras duas espécies (64.000 e 67.000); e o seu pI (7,2) é ca duas unidades acima (5,1 e 5,6) (Tabelas 14-16); (2) a amilase de *P. termitilluminans* mantém-se ativa por isoeletrofocalização, eletroforese e ultracentrifugação em gradiente de glicerol, para medidas de pI e peso molecular, enquanto que esta enzima não pode ser detectada nos extratos brutos das outras espécies. Mostraria esta inativação uma dependencia de calcio?; (3) Os valores de Km para a celulose, amilase, α -e β -glicosidase de *P. termitilluminans* são maiores que os encontrados para as respectivas enzimas das outras espécies; (4) A β -glicosidase de

P.termitilluminans exibe um perfil de isoeletrofocalização com apenas um pico ($pI = 5,2$) enquanto que as outras duas espécies mostraram dois ($pI = 5,8$ e $6,6$, Tabelas 15-16); (5) apesar de as três espécies possuírem atividades similares de tripsina, *P.termitilluminans* apresentou ter a mais alta atividade de aminopeptidase (50 mU/mg.prot.). Importante notar que os K_m da aminopeptidase-LpNA são bastante similares nas grandezas ($ca = 0,75$ mM).

De acordo com os dados obtidos, podemos sugerir que os dois gêneros de elaterídeos luminescentes habitantes de troncos, possuem propriedades físico-químicas bastante parecidas, sendo então mais similares filogeneticamente, independentemente do gênero da espécie não identificada (*Pyrearinus* ou *Hapsodrilus*). O que sugere que o "habitat" tenha exercido forte pressão durante a evolução dessas espécies. E finalmente, analisando-se os itens acima, pode-se também dizer que *P.termitilluminans* parece ser o mais evoluído das três espécies. Redford (1982), quando descreveu o fenômeno da bioluminescência dos "cupinzeiros" citou que a emissão de luz deveria ser proveniente de "uma espécie extremamente evoluída", devido ao ambiente, ao fator social e a maneira de como esses insetos atraem suas presas.

5.Principais Conclusões:

1. A bioluminescência proveniente dos Elateridae e Lampyridae são quimicamente muito semelhantes: ambas requerem ATP como cofator, oxigênio molecular e um íon metálico bivalente . Demonstramos aqui , além disto que as treze espécies de Elateridae (duas tribos, cinco gêneros), possuem uma luciferina estruturalmente similar à de Lampyridae, independentemente do estágio de metamorfose (ovo, larva, pupa e adulto) e origem da lanterna (abdomen ou protórax).
2. A emissão de luz pelas larvas de Elateridae provavelmente serve à caça (atração da presa) e proteção/defesa (distracção do predador).
3. O regurgitado injetado pelas larvas de Elateridae em suas presas, antes de digeri-las, contém uma mistura de proteases e carbohidrases altamente tamponadas que deve iniciar uma digestão extra-corpórea.
4. Comparando-se as propriedades físico-químicas das hidrolases encontradas nos regurgitados das espécies que habitam troncos de árvores em fase de apodrecimento e de *P.termitilluminans* (que vive em cupinzeiros; ambiente altamente predatório), sugere que esta espécie é a mais evoluída que os outros elaterídeos estudados.

5. A organização espacial da digestão de larvas de *P.termitilluminans* e as propriedades de suas enzimas digestivas sugerem que esta espécie deve ter algum ancestral holometábola vegetariano, podendo-se extrapolar o mesmo para as outras duas espécies estudadas, apesar de não se ter mapeado enzimáticamente seus tubos digestivos.

6. Nos insetos adultos, o espectro de bioluminescência dos órgãos luminosos do abdômen (verde-amarelado) sempre está deslocado (de 20 a 40 nm) em direção ao vermelho, com relação à lanterna protorácica respectivamente. Embora as diferenças nos máximos de emissão não sejam suficientemente grandes para discriminar as espécies *Pyrophorus*, elas podem auxiliar, na taxonomia dos gêneros *Pyrearinus* e *Hapsodrilus*. Todas as larvas estudadas aqui podem ser identificadas pelo seu pico de emissão.

7. Estudo físico-químico preliminar com extratos brutos de lanternas de elaterídeos, sugere que as luciferases presentes no órgão do protórax e do abdomen são isoenzimas. O mesmo pode ser sugerido para cada estágio de metamorfose desse inseto.

8. A intensidade da bioluminescência "in vivo" de ovos e larvas aumenta sensivelmente com o aumento da temperatura. Isto pode ter uma importância biológica no mecanismo de caça da larva e de proteção, no caso de ovos.

9. A curva temporal de incorporação de cistina radiativa na formação da luciferina apresenta um patamar após 24 horas (rendimento de ca 4%); provavelmente a incorporação da segunda cistina na quinona correspondente seja a etapa regulatória dessa via biossintética.

10. As larvas de Elateridae luminescentes (3 espécies) apresentam 5-15 vezes mais atividade enzimática de SOD que os elaterídeos não-luminescentes (4 espécies); *P.termitilluminans*, que vive em galerias bem aeradas em termiteiros é 3 vezes mais rico em SOD que as outras duas espécies que vivem em troncos em fase de apodrecimento, onde a tensão de oxigênio é inferior a 2%.

11. A distribuição das atividades de SOD e catalase ao longo do corpo de larvas não luminescentes é constante, porém encontrou-se duas vezes mais atividade de SOD nos tecidos luminescentes de *P.divergens* e *P. termitilluminans* (que é; o protórax e, somente no caso de *P.termitilluminans*, também nos dois últimos segmentos abdominais).

12. Os itens 10 e 11 sugerem que há uma direta conexão entre a geração de radicais de oxigênio, bioluminescência e disponibilidade de oxigênio molecular no "habitat".

6. Bibliografia.

Ackrell, B.A.C., E.B. Kearney e T.P. Singer, (1978).em "Methods in Enzymology" (S.Fleisher e C. Packer, eds.) vol. 53. Academic Press Inc., New York. pp. 466.

Alter, S.C. e M.Luca, (1986). *Biochemistry*, 25, 1599-1605.

Ambruso, D.R.e R.B. Johnston, (1981).*J. Clin. Invest.*,67, 352.

Anctil, M., (1979). *Photochem. Photobiol.*,30, 777-780.

Atkinson, G.F.,(1887). *Am. Nat.*, 21, 853-856.

Autor, A.P., (ed.)(1982). "Pathology of Oxygen". Academic Press Inc., New York, 368 páginas.

Bell, D.H., J.M. Gould e L.K. Patterson, (1982). *Rad. Research*, 90, 519-525.

Bény, M. e M. Dolivo, (1976). *FEBS. Lett.*, 70, 167-170.

Bielmond, P., H.G. Van Eijk, A.J.G. Swaak e J.F. Koster, (1984). *J. Clin. Invest.*, 73, 1576.

Biggley, W.H., J.E. Lloyd e H.H. Seliger, (1967). *J. gen. Physiol.*, 50, 1681-1692.

Bitler, B. e W.D. McElroy, (1957). *Arch. Biochem. Biophys.*, 72, 358-368.

- Bradford, M.M., (1976). *Analyt. Biochem.*, 72, 248.
- Branchini, B.R., T.M. Marschner e A.M. Montemurro, (1980).
Anal. Biochem., 104, 386-396.
- Brinks, J.R., F.G. Prendergost e D.G. Allen, (1976).
Pharmac. Rev., 28, 1-93.
- Brues, C.T.(ed.) (1946). "Insect Dietary", Harvard University Press, Cambridge.
- Case, J.F. e L.G. Strause, (1978). em "Bioluminescence in Action", (P.J. Herring, ed.). Academic Press, New York, pp. 331.
- Chance, B., H. Sies e A. Boveris, (1979). *Physiol. Rev.*, 59, 527.
- Chapman, R.F.(ed.) (1974). "The Insects Structure and Function" English University Press, London, pp. 112
- Cheeseman, M.T. e G. Pritchard, (1984a). *Can. J. Zool.*, 62 1200-1203.
- Cheeseman, M.T. e G. Pritchard, (1984b). *Int. J. Insect Morph. Embryol.*, 13, 171.
- Cheung, A.C. e R.H. Gooding, (1970). *Comp. Biochem. Physiol.*, 37, 331.
- Cormier, M.J., (1978). em "Bioluminescence in Action" (P.J. Herring, ed.), Academic Press, New York, pp.75-108.

Cormier, M.J. e L.S. Dure (1963). *J. Biol. Chem.*, 238, 785.

Cormier, M.J., J.M. Crane e Y. Nakano, (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 747.

Cormier, M.J., K. Hari, J.M. Anderson, (1974). *Biochem. Biophys. Res. Acta*, 346, 134.

Cormier, M.J., J. Lee e J.E. Wampler, (1975). *Am. Rev. Biochem.*, 44, 255-271.

Costa, C., (1968). *Papeis Avulsos Zool. São Paulo*, 22, 61-83.

Costa, C., (1970). *Papeis Avulsos de Zool. São Paulo*, 23, 69-76.

Costa, C., (1971). *Papeis Avulsos de Zool. São Paulo*, 24, 113-116.

Costa, C., (1972). *Papeis Avulsos de Zool. São Paulo*, 25, 199-227.

Costa, C., (1975). *Arq. Zool. São Paulo*, 26, 49-190.

Costa, C., (1976). *Papeis Avulsos Zool. São Paulo*, 29, 141-154.

Costa, C., (1978). *Arq. Zool. São Paulo*, 29, 185-236.

Costa, C., (1980). *Papeis Avulsos Zool. São Paulo*, 33, 157-176.

- Costa, C., (1982). *Revta. bras. Zool.* São Paulo, 1, 23-30.
- Costa, C., S.A. Vanin e P. Colepicolo-Neto, (1986).
Papeis Avulsos de Zool. São Paulo, no prelo.
- Cotton, M.L. e H.B. Dunford, (1973). *Can. J. Chem.*, 51
582.
- Crowson, R.A., (ed.), (1981). "The Biology of the Coleoptera"
Academic Press, New York, pp. 188-191 e pp.230-231.
- Dadd, R.H., (1956). *J. exp. Biol.*, 33, 311.
- Day, M.F. e R.F. Powning, (1949). *Aust. J. Sci. Res.*, 2,
175.
- DeDuve, C., (1973). *J. Histochem. Cytochem.*, 21, 941.
- DeDuve, C. e P. Baudhuin, (1966), *Physiol. Rev.*, 46, 323.
- DeLuca, M., (1976). em "Advances in Enzymology" (A. Meister,
ed.) Interscience. New York, vol.22, pp 37-68.
- DeLuca, M., (1984). *Curr. Top. Cell. Res.*, 24, 189-196.
- DeLuca, M. e M. Dempsey, (1971). *Biochem. biophys. Res.
Commun.*, 40, 117-122.
- DeLuca, M. e W.D. McElroy, (1974). *Biochemistry*, 13,
921-925.
- DeLuca, M. e W.D. McElroy, (1978). Em "Methods in

Enzymology". (M.A. DeLuca, ed.) vol.LVII, Academic Press, New York, pp 3-15.

DeLuca, M., J. Wannlund e W.D. McElroy, (1979). *Anal. Biochem.*, 95, 194-198.

DeLuca, M., M.E. Densley, K.Hori e M.J. Cormier, (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 262-267.

De Wet, J.R., K.U. Wood, D.R. Helinki e M. DeLuca, (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7870-7873.

Drew, H.D.K. e F.H. Perman, (1937). *J. Chem. Soc.*, 26, 586.

Dubois, R., (1885). *C. r. Seanc. Soc. Biol. Paris* (ser.8), 2, 559-562.

Dubois, R., (1886). *Bull. Soc. zool. Fr.*, 11, 1-275.

Dunlop, J.C., J.W. Hastings e O. Shimomura, (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 1394.

Espinosa-Fuentes, F.P., C. Ferreira e W.R. Terra, (1984). *Insect Biochem.*, 14, 631.

Fantone, J.C., P.A. Ward, (1982). *Am. J. Path.*, 107, 397.

Ferreira, C. e W.R. Terra, (1980). *Comp. Biochem. Physiol.* 66B, 467.

Foote, C.S., (1982). em "Pathology of Oxygen" (A.Autor, ed.) Academic Pres,. New York, pp 21.

- Fridovich, I., (1972). *Acc. Chem. Res.*, 5, 321.
- Fridovich, I., (1974). em "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation". (O. Hayaishi, ed.), Academic Press, Inc, New York, p.453.
- Fridovich, I., (1975). *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 147.
- Fridovich, I., (1979). em "Advances in Inorganic Biochemistry". (G.L. Eichhorn e L.G. Marzili), Elsevier/North Holland, New York, pp. 67-90.
- Fridovich, I., (1982). em "Pathology of Oxygen" (A. Autor, ed.), Academic Press, Inc, New York, p.1.
- Garcia, E.S. e M.L.M. Garcia, (1977). *J. Insect Physiol.*, 23,, 247.
- Ghirodella, H., (1978). *J. Morph.*, 153, 187-204.
- Gooding, R.H., (1975). *Acta trop.*, 32,, 96.
- Green, A.A. e W.D. McElroy, (1956). *Biochim. Biophys. Acta.*, 20, 170-176.
- Hanna, C.H., T.A. Hopkins e J. Buck, (1976). *J. Ultrastr. Res.*, 57, 150.
- Harvey, E.N., (1952). em "Bioluminescence", Academic Press, New York.

- Hassan, H.M. e I. Fridovich, (1977). *J. Bact.*, 129, 1574.
- Hassan, H.M. e I. Fridovich, (1979). *Rev. Infect. Dis.*, 1
357.
- Hastings, J.W., (1966). *Curr. Top. Bioenerg.*, 1, 113-152.
- Hastings, J.W., (1976). *Oceanus*, 19, 17-27.
- Hastings, J.W., (1983). *J. Mol. Evol.*, 19,, 309-321.
- Hastings, J.W., (1985). *Adv. Microb. Physiol.*, 26,
235-291.
- Hastings, J.W. e A.M. Michelson, (1974). *La Recherche*, 5,
1032-1042.
- Hastings, J.W. e T.Wilson, (1976). *Photochem. Photobiol.*, 23
461-473.
- Hendrick, J.L. e A.J. Smith, (1968). *Archs. Biochem.
Biophys.*, 126, 155.
- Herring, P.J. (1977). *Nature*, 267, 788-793.
- Herring, P.J. (ed.), (1978). em "Bioluminescence in Action",
Academic Press, New York, pp 461-551.
- Horn, K.A., J.K. Koo, S.P. Schmidt e G.B. Schuster, (1978).
Mol. Photochem., 9, 1-37.

Johnson, F.H. e O. Shimomura, (1978). em "Methods Enzymology", 57, 271.

Kishi, Y., S. Matsuura, S. Inoue, O. Shimomura e T. Goto, (1968). *Tetrahedron Lett.*, 24, 2847-2850.

Koo, J.-Y., S.P. Schimidt e G.B. Schuster (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 30.

Kricka, L.J. e M. DeLuca, (1982). *Arch. Biochem. Bioph.* 217, 674-681.

Lenko, K. e N. Papavero, (1979). em "Insetos no Folclore", São Paulo: Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas, pp.379-406.

Lloyd, J.E., (1978). em "Bioluminescence in Action", (P.J. Herring, ed.) , Academic Press, New York, pp 241-272.

Maral, J., K. Puget e A.M. Michelson, (1977). *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 77, 1525.

Marklund, S.L., (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 7634.

Marklund, S.L., E. Holmes e L. Hellner, (1982). *Clinica chim. Acta.*, 126, 41.

Martin, R.G. e B.N. Ames, (1961). *J. biol. Chem.*, 236, 1372.

McCapra, F., (1970). *Pure Appl. Chem.*, 24, 611-629.

- McCapra, F., (1973). *Endavour*, 32, 139-145.
- McCapra, F., (1976). *Acc. Chem. Res.*, 9, 201-208.
- McCapra, F., (1977). *J. C. S. Chem. Commun.*, 946-948.
- McCapra, F. e Z. Razavi, (1976). *J. Chem. Soc. Commun.*, 43,, 153-154.
- McCord, J.M. e I. Fridovich, (1968). *J. Biol. Chem.*, 243, 5753.
- McCord, J.M. e E.D. Day, (1978). *FEBS Lett.*, 86, 139.
- McElroy, W.D. e M. DeLuca, (1973). em "Chemiluminescence and Bioluminescence", (M.J. Cormier, D.M. Hercules e J. Lee, eds.), Plenum Press, New York, pp. 285-311.
- McElroy, W.D. e M. DeLuca, (1978). em "Bioluminescence in Action", (P.J. Herring, ed.), Academic Press, New York, pp.109-125.
- McElroy, W.D. e M. DeLuca, (1983). *J. Appl. Biochem.*, 5, 197.
- McElroy, W.D., H.H. Seliger e E.H. White, (1969). *Photochem. Photobiol.*, 10, 153-170.
- McLennan, G. e A.P. Autor, (1982). em "Pathology of Oxygen", (A. Autor, ed.), Academic Press, New York, pp 85-97.
- Michelson, A.M., J.M. McCord e I. Fridovich, (eds.), (1977). "Superoxide and Superoxide Dismutase", Academic Press, Inc,

London, 568 páginas.

Mitchell, G.W. e J.W. Hastings, (1971). *Anal. Biochem.*, 39, 243.

Moyer, J.D. e J.F. Henderson, (1983). *Anal. Biochem.*, 131, 187-189.

Nicholls, P. e G.R. Schaumbaum, (1963). em "The Enzyme", (P.D. Boyern, H. Lordy e K. Myrbock, eds.), vol. 8, p. 147.

Nishinaga, A., (1977). em "Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen", (O. Hayaishi e K. Asada, ed.), University Park Press, Tokio, p. 13.

Novikoff, A.B., P.M. Novikoff, N. Quintana e C. Davis, (1973). *J. Histochem. Cytochem.*, 21, 1010.

Okada, K. H. Iio, I. Kubota e T. Goto, (1974). *Tetrahedron Lett.*, 32, 2771.

Ohtsuka, H., N.G. Rudie e J.E. Wampler, (1976). *Biochemistry*, 15, 1001.

Prota, G. e E.A. Ponsiglione, (1972). *Tetrahedron Lett.*, 30, 1327.

Rajgopal, J. e M. Vijayalokshimi, (1982). *J. Chromatogr.*, 243, 164-167.

Rauhut, M.M., (1969). *Acc. Chem. Res.*, 2, 80-87.

- Redford, K.H., (1982). *Revta. bras. Zool.* São Paulo, 1, 31-34.
- Redford, K.H., (1984). *Biotropica*, 16, 112-119.
- Roda, A., S. Girotti, B. Grigolo e S. Ghini, (1983). *Giorn. It. Chim. Clin*, 8, 309-369.
- Rosendahl, M.S., N.J. Leonard e M. DeLuca, (1982). *Photochem. Photobiol.*, 35, 857-861.
- Santos, C.D. e W.R. Terra, (1984). *Insect Biochem.*, 14, 587.
- Santos, C.D. e W.R. Terra, (1986). *Insect Biochem.*, MS268.
- Santos, C.D., C. Ferreira e W.R. Terra, (1983), *J. Insect Physiol.*, 29, 707.
- Schaap, A.P. e S.D. Gagnon, (1982). *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 3504-3506.
- Schonbaum, G.R. e B. Chance, (1976). em "The Enzymes", (P.D. Boyer, ed.), Academic Press, New York, vol XIII, p.363.
- Seliger, H.H. e W.D. McElroy, (1960). *Arch. Biochem. Biophys.*, 88, 136-141.
- Seliger, H.H. e W.D. McElroy, (1964). *Proc. N.A.S.*, 52, 75-81.
- Seliger, H.H. e W.D. McElroy, (1965). Em "Light: Physical and Biological Action", Academic Press, New York, pp 417.

Seliger, H.H., J.B. Buck, W.G. Fastie e W.D. McElroy, (1964).
J. Gen. Phys., 48, 95-104.

Seliger, H.H., A.B. Lall, J.E. Lloyd e W.H. Biggley, (1982a).
Photochem. Photobiol., 36, 673-680.

Seliger, H.H., A.B. Lall, J.E. Lloyd e W.H. Biggley, (1982b).
Photochem. Photobiol., 36, 681-688.

Shimomura, O., (1981). *FEBS Lett.*, 128, 242.

Shimomura, O., (1983). *Photochem. Photobiol.*, 38,, 773.

Shimomura, O. e F.H. Johnson, (1966). em "Bioluminescence in Progress", (F.M. Johnson e Y. Honeda, eds.), Princenton University Press, pp.495.

Shimomura, O. e F.H. Johnson, (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 59, 475.

Shimomura, O. e F.H. Johnson, (1979). *Photochem. Photobiol.*, 30, 89-91.

Shimomura, O., T.Goto e F.H. Johnson, (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 2799-2802.

Schombaum, G.R. e B. Chance, (1976). em "The Enzyme", (P.D. Boyer, ed.), Academic Press, New York, pp 363.

Silva, P., (1958). Em "notícias do Brasil". Biblioteca Histórica Brasileira, (R.B. Moraes, diretor) vol XVI, Livraria Martins

Editora, p. 346.

Snodgrass, R.E., (1935). "Principles of Insect Morphology", McGraw-Hill, New York.

Steinman, H.M. e R.L. Hill, (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 70, 3725.

Strause, L.G. e M. DeLuca, (1981). *Insect Biochem.*, 11, 417-422.

Strause, L.G. e J.F. Case, (1981). *Insect Physiol.*, 27, 5-15.

Terra, W.R. e C. Ferreira, (1981). *J. Insect Physiol.*, 27, 325.

Terra, W.R. e C. Ferreira, (1983). *Insect Biochem.*, 13, 143.

Terra, W.R., C. Ferreira e A.G. De Bianchi, (1978). *Biochim. biophys. Acta.* 524, 131.

Terra, W.R., C. Ferreira e A.G. De Bianchi, (1979). *J. Insect. Physiol.*, 25, 487.

Terra, W.R., C.Ferreira e F.Bastos, (1985). *Insect Biochem.*, 15, 443.

Theorell, H., (1951). em "The Enzyme", (J.B. Sumner e K. Myrback, eds.), Vol II, Academic Press, New York, p.397.

Ugarova, N.N., L.Y. Brooko e N. Kost, (1982). *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 224-228.

Ullrich, V., (1983). em "Oxygen Radicals in Chemistry and Biology" (W. Bors, ed.), Walter de Gruyter, Berlin, pp 391.

Van-Dyke, K. (ed.), (1985). Em "Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications". CRC Inc., Florida, vol.I, pp 231 e vol.II, pp 269.

Wada, N., M. Honda, H. Suzuki, (1985). *J. Phys. Soc. Jpn.* 54, 4851-4860.

Wannlund, J., M. DeLuca, K.E. Stempel e P.D. Bayer, (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 81, 987-992.

Waterhouse, D.F., (1953). *Aust. J. Zool.*, 1, 299.

White, E.H. e B.R. Branchini, (1975). *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1243.

White, C.W. e J.E. Repine (1985). *Experimental Lung Research*, 8, 81.

White, E.H., F. McCapra, G. Field e W.D. McElroy, (1961). *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 2402-2403.

White, E.H., J.D. Miano e M. Umbreit, (1975). *J. Am. Chem., Soc.*, 97, 198-200.

White, E.H., H. Worther, H.H. Seliger e W.D. McElroy, (1966). *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2015-2019.

White, E.H., E. Rapaport, T.A. Hopkins e H.H. Seliger, (1969).
J. Am. Chem. Soc., 91, 2178-2180.

White, E.H., E. Rapaport, H.H. Seliger e T.A. Hopkins, (1971).
Bioorg. Chem., 1,, 92-122.

Wienhausen, G. e M. DeLuca, (1985). *Photochem.*
Photobiol., 42, 609-611.

Wigglesworth, V.B., (1930). *Bull. ent. Rev.*, 20, 403.

Wigglesworth, V.B., (1972). em "The Principles of Insect
Physiology", sétima edição, Methuen, London.

Wilkinson, G.W., (1961). *Biochem. J.*, 80, 324.

Apêndice

Aplicações Analíticas e Clínicas da Bioluminescência de Vagalumes

O primeiro passo para a descoberta da aplicação da bioluminescência para a dosagem de nucleotídeos foi dado em 1947 quando McElroy⁽¹⁾ identificou como possível substrato para a L'ase o ATP. A alta especificidade e ultrasensibilidade dessa enzima por ATP levou os cientistas de todo o mundo a pesquisarem a aplicabilidade do sistema luciferina/luciferase de vagalumes na determinação de todos os metabólitos e enzimas de cuja reação⁽²⁾ participa este nucleotídeo .

Por estes motivos e o largo intervalo constatado de linearidade da resposta de luz à concentração de ATP (Figura que segue),houve numerosos avanços no campo de pesquisa analítica em bioquímica, biologia, imunologia, medicina, oceanografia, agraria e ecologia (Tabela).

Na realidade, o primeiro inconveniente para a utilização rotineira do sistema bioluminescente para a determinação de ATP, está no alto grau de purificação que a enzima tem que estar e na estabilidade . Porém a descoberta da possibilidade da imobilização de L'ase, derrubou definitivamente essa barreira. Como foi dito no item 1.2.1.3 a luciferase é inibida por pirofosfato, AMP, oxiluciferina e pela dehidroluciferina, portanto é também importante conhecer-se as condições experimentais em que essas substâncias não alteram a

cinética da reação.

Figura. Intervalo de linearidade da dosagem de ATP mediante a luciferina/luciferase de lampirídeos em tampão Tris-acetato 0,1M a pH 7,75.

Os instrumentos utilizados para a detecção da bioluminescência são bastante simples, automatizados, e de custo relativamente baixo. Por exemplo, pode-se utilizar fotômetros dotados de fotomultiplicadoras de alta sensibilidade, como os descritos em materiais e métodos.

Para as dosagens de ATP já existe no comércio "kits" para o uso imediato. Estes "kits" têm um preço de aproximadamente de US\$ 30.00 para 10 dosagens.

A luciferase de Elateridae, como visto anteriormente, também requer ATP como cofator de reação, portanto todos os métodos já descritos na literatura podem ser substituídos por esta enzima. Para isso, temos investido parte da pesquisa bioluminescente na purificação e caracterização físico-química dessa enzima. Extratos semi-purificados de lanternas de protórax e abdômen de adultos de *P. divergens*, têm sido testados e por três anos não houve perda significativa de atividade enzimática quando conservados a -20°C . Para dosagens de ATP com extratos brutos de Elateridae, portanto confecção de curvas-padrão do tipo Michaelis-Menten ou projeções de Arrhenius, ou mede-se o máximo de emissão de luz após 30 segundos, ou mede-se a área da parte hachurada da curva, como mostrado na Figura 2.

(60)
Durán e Haun revisaram recentemente as múltiplas aplicações analíticas da bioluminescência, onde incluíram também os tipos de equipamentos disponíveis no comércio para medidas de emissão de luz.

Determinação e Substratos (Metabólito) e de Atividades
Enzimáticas Usando-se Luciferina/Luciferase
de Vagalumes

Material Analisado	Intervalo de Aplicação	Bibliografia
ADP	10 pmol-1 nmol	3,4,5,6,7,8,9
Adenosina fosfosulfato	-	10
Adenosina tetrasulfato	-	11
AMP	4 pmol-20 pmol	6
AMPc	(0,7 pmol)	12,13
ATP	1 fmol-1 nmol	6,8,14,15,16, 17,18,19
CTP	-	20
Coenzima A	20 nmol-0,8 umol	21
Creatina	-	20
Creatina fosfato	10 pmol-50nmol	16
Creatinina	-	22
1,3 difosfoglicerato	10 pmol-10 nmol	23
Digossina	-	24
Fosfoenolpiruvato	10 pmol-1 nmol	20,25,26
GMPC	-	27
Glicerol	-	28,29
Glicose	-	30,31
GTP	4 pmol-80 nmol	20, 32, 33
Luciferina	-	34
NAD/NADH	(2,5pmol)/(2,5pmol)	35
Pirofosfato	-	36,37
Triglicerídeo	-	28,38
UTP	-	20
Adenilato quinase	-	39,40,41
Amido sintetase	1 pmol-1nmol	42
AMPc-fosfodiesterase	-	43,44
Apirase	-	20
Arginil-RNAsintetase	-	45
ATP-ase	-	20,46,47
ATP-fosfobolsiltransferase	-	48
ATP-sulforilase	-	10,49
Creatina quinase	1U/L-1000U/L	50,51,52,53
Creatina quinase sub.B	1U/L-1000U/L	50,52,54,55
Glicerol quinase	-	28
GMPC-fosfodiesterase	-	27
Mioquinase	-	20
Nucleotidfosfoquinase	-	20
Piruvato quinase	-	57,58
Protease	-	59

REFERÊNCIAS DO APÊNDICE

1. McElroy, W.D.: The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 33, 342, 1947.
2. Roda, A., Girotti, S., Grigolo, B., Ghini, S.:
Bioluminescenza: Teoria ed applicazioni analitiche.
Giornale italiano di chimica clinica, 8, 309, 1983.
3. Holmes, H., Storm, E., Day, H.J.: Determination of ATP and ADP in blood platelets: A modification of the firefly assay for plasma. *Anal. Biochem.* 46 489, 1972.
4. Halmmar, H.: ATP and ADP levels and epidermal replacement rate in the normal human skin and in some populosquamous diseases of the skin. *Acta Dermatovenen.* (Stockolm) 53, 251, 1973.
5. David, J.L., Herion, F.: Assay of platelet ATP and ADP by the luciferase method: some theoretical and practical aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 34, 341, 1972.
6. Kimmich, G.A., Randles, J., Brand, J.: Assay of picomole amounts of ATP, ADP and AMP using the luciferase enzyme system. *Anal. Biochem.* 69, 187, 1975.

7. Jabs, C.M., Ferrel, W.J., Robb, H.J.: Plasma ADP levels: direct determination with luciferase luminescence using a biometer. *Clin Biochem.* 11, 190, 1978.
8. Larsson, C.-M., Olsson, T.: Firefly assay of adelanine nucleotides from algae: Comparison of extraction methods. *Plant & Cell Physiol*, 20, 145, 1979.
9. Feraudi, M., Gaertner, G., Kolb, J., Weicker, H.: Bioluminescent and fluorimetric techniques for determinations of 19 metabolites of ADP/ATP-dependent transformation in energy metabolism in 200 (or 400 mg) muscle. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 193, 1983.
10. Balharry, G.J.E., Nicholas, D.J.D.: New assay for ATP sulphurylase using the luciferin-luciferase method. *Anal. Biochem.* 40, 1, 1971.
11. Manandhar, M.S.P., Van Dyke, K.: Adenosine tetraphosphate analysis: Polyethylenimine (PEI) thin layer purification and firefly-extract liquid scintillation quantitative. *Anal. Biochem.* 58, 368, 1974.
12. Johnson, R.A., Hardman, J.G., Broadus, A.E., Satherland, E.W.: Analysis of adenosine 3'-5' monophosphate with the luciferase luminescence. *Anal. Biochem.* 35, 91, 1970.

13. Turner, G.A., Mazlan, M., Ellis, R.D.: A simple sensitive and rapid method for the estimation of cyclic AMP in urine using luciferase luminescence. *Clin. Chim. Acta* 122, 425, 1982.
14. Leah, F.R.: ATP determinations with firefly luciferase. *J. Appl. Biochem.* 3, 473, 1981.
15. Lundin, A., Thore, A.: Analytical information obtainable by evaluation for time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP. *Anal. Biochem.* 66, 47, 1975.
16. Jabs, C.M., Ferrel, W.J., Robb, H.J.: Microdetermination of plasma ATP and creatine phosphate concentrations with a luminescence biometer. *Clin. Chem.* 23, 2254, 1977.
17. Wettermark, G., Stymne, H., Brolins, S.E., Petersson, B.: Substrates analysis in single cells. I. Determination of ATP. *Anal. Biochem.* 63, 293, 1975.
18. Karl, D.M., Holm-Hansen, O.: Effects of luciferin concentration on the quantitative assay of ATP using crude luciferase preparations. *Anal. Biochem.* 75, 100, 1976.
19. Darmont, C., Philippon, A., Paul, G., Nevot, P.: Rapid determinations of gentamicin by bioluminescence. *Phatol. Biol.* 30, 124, 1982.

20. Strehler, B.L.: Bioluminescence assay: Principles and practice. *Methods Biochem. Anal.* 16, 99, 1968.
21. Strehler, B.L., McElroy, W.D.: The assay of adenosine triphosphate. *Methods Enzymol.* 3, 871, 1957.
22. Collins, J.S., Ginman, R.: Bioluminescence as an analytical technique for determination of reatinine. *Med. Lab. Sci.* 40. 129, 1983.
23. Momnsen, G.: Determination of 1,3-diphosphoglycerate and the intermediate in the human red blood cell by the firefly luciferase method. *Anal. Biochem.* 82, 463, 1977.
24. Vanstaen, H.: Bioluminescent diagoxin assay.
Proceedings from the International Symposium on Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence, pag. 154, E. Schram and P. Stanley, Eds., State Printing and Publishing Inc., California, 543.
25. McCoy, G.D., Daeg, R.A.: A simplified assay for phosphoenolpyruvate. *Anal. Biochem.* 64, 115, 1975.

26. Idahl, L.A.: Assay of subpicomol amounts of phosphoenolpyruvate using the firefly luciferase system. Proceedings from the International Symposium on Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence, pag. 154, E. Schram and P. Stanley, Eds., State Printing and Publishing Inc., California, 401, 1979.
27. Fertel, R., Weiss, B.: A microassay for guanosine 3'-5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Anal. Biochem.* 59, 386, 1974.
28. Hercules, D.M., Sheeman, T.L.: Chemiluminescent determination of serum and tryglicerides. *Anal. Chem.* 50, 22, 1978.
29. Bjorkhem, Arner, P., Thore, A., Ostman, J.: Sensitive kinetic bioluminescent assay of glycerol relase from human fat cells. *J. Lipid Res.* 22, 1142, 1981.
30. Cavari, B.Z., Phelps, G.: Sensitive enzymatic assay for glucose determination in natural waters. *Appl. Envir. Microbiol.* 33, 1237, 1977.
31. Paschen, W., Niebur, I., Hossmann, K.A.: A bioluminescent method for the demonstration of regional glucose distribution in brain slice. *J. Neurochem.* 36, 513, 1981.

32. Manandhar, M.S., Van Dyke, K.: Guanosine triphosphate
PEI-thin layer purification and luciferin-luciferase liquid
scintillation quantitation. *Anal. Biochem.* 60, 122,
1974.
33. Karl, D.M.: A rapid, sensitive method for the measurement of
guanine ribonucleotides on bacterial and environmental
extracts. *Anal. Biochem.* 89, 581, 1978.
34. Moyer, J.D., Henderson, J.F.: Nucleoside triphosphate
specificity of firefly luciferase. *Anal. Biochem.* 131,
187, 1983.
35. Idahl, L.A.: Ultrasensitive assay of NAD/NADH with firefly
luciferin. *Ref.* 10, 627, 1981.
36. Goodrich, G.A., Buvell, H.R.: Micromasurement of Nucleoside
5'-Triphosphate using coupled bioluminescence. *Anal.*
Biochem. 127, 395, 1982.
37. Stanley, P.E. in *Chemiluminescence and Bioluminescence*, p.
494, M.J. Cornier, D.M. Hercules and J. Lee, Eds., Plenum
Prenum Press, New York, 1973.
38. Bjorkhen, I., Sandelin, K., Thore, A.: A simple, fully
enzymatic bioluminescence assay for triglycerides.
Clin. Chem. 28, 1742, 1982.

39. Brolin, S.E., Borglund, E., Agreen, A.: Photokinetic microassay of adenylate kinase using the firefly luciferase reaction. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1, 163, 1979.
40. Brolin, S.E., Wersaell, J.P., Agreen, A.: Firefly luciferase assay of adenylate kinase in insulin and glycogen producing cell. *Reg.* 24, 458, 1979.
41. Lundin, A., Karnell Lundin, U., Baltshheffsky, M.: Adenylate kinase activity associated with coupling factor ATP-ase in *Rhodospirillum rubrum*. *Acta. Chem. Scand*, 333, 608, 1979.
42. Ching, T.M.: A sensitive and simple assay of starch syntethase activity with pyruvate kinase and luciferase. *Anal. Biochem.* 122, 139, 1982.
43. Weiss, B., Lehne, R., Strada, S.: Rapid microassay of adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Anal. Biochem.* 45, 222, 1972.
44. Fertel, R., Weiss, R.: Measurement of the acitivity of cyclic nucleotide phosphodiesterases with firefly luciferin-luciferase coupled assay system. *Methods Enzymol.* 57, 94, 1978.

45. Charlier, J., Gadeau, J.M.: Bioluminescence measurement of ATP consumption by Arginyl-t-RNA synthase. *Ris.* 24, 363, 1979.
46. Balcheffsky, M., Lundin, A.: Flash-induced increase of ATP-ase activity in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. Cation flux across biomembranes, pag. 208, Y. Mukohaka and L. Parker, Eds., Academic Press, New York, 1979.
47. Weissberg, P.L., Wilkins, M.R., Kricka, L.J.: Test for
+ +
circulating Na K ATPase inhibitors. *Lancet* 28, 1229, 1983.
48. Kleeman, J., Parson, S.M.: A sensitive assay for the reverse reaction of the first histidine biosynthetic enzyme. *Anal. Biochem.* 68, 236, 1975.
49. Schmutz, D., Brunold, C.: Rapid and simple measurement of ATP-Sulfurylase activity in crude plant extracts using an ATP meter for bioluminescence determination. *Anal. Biochem.* 121, 151, 1982.
50. Lundin, A., Styrelius, I.: Sensitive assay of creatinine kinase isoenzymes in human serum using M subunit inhibiting antibody and firefly luciferase. *Clin. Chim. Acta* 87, 199, 1978.

51. Zelleweger, H., Antonik, A.: Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics* 55,30, 1975.
52. Witteveen, S.A., Sobel, S.E., DeLuca, M.: Kinetic properties of the isoenzymes of human creatinine phosphokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1384, 1974.
53. Messeri, G., Caldini, A.L., Tozzi, P., Pazzagli, M.: Bioluminescence e sue applicazioni in chimica clinica: determinazione della creatina-chinasi sierica nel sistema luciferina-luciferasi. *Giorn. It. Chim. Clin.* 5, 261, 1980.
54. Wulff, K., Stahler, F., Gruber, W.: Standard assay for total creatinine kinase and the MB-Isoenzyme in human serum with firefly luciferase. *Bioluminescence and Chemoluminescence*, pag. 187, M. DeLuca and W.D. McElroy, Eds., Academic Press, New York, 1981.
55. Lundin, A., Jaderlund, B., Lovgren, T.: Optimized bioluminescence assay of creatinine kinase and creatinine kinase B-submit activity. *Clin. Chem.* 28, 609, 1982.

56. Halonen, T., Nanto, V., Frey, H., Lovgren, T.:
Bioluminescence assay of total and brain-specific creatinine
kinase activity in cerebrospinal fluid.
J. Neurochem. 39, 1982.
57. Lundin, A. Rickardson, A., Thore, A.: Substrate and enzyme
determinations by continuously monitoring the ATP by a
purified luciferase reagent. 2nd biannual ATP methodology
symposium, pag. 441, SAI Technology, San Diego, CA, 1977.
58. Hammar, H.G., Wettermark, G., Wladimiroff, W.:
Bioluminescence assay of enzymes obtained from buccal
epithelium by superficial scraping. *Scand. J.*
Dent. Res. 83, 375, 1975.
59. Norton, P.T., Merz, R.L., Leach, F.R.: The inactivation of
firefly luciferase by proteolytic enzymes. An assay for
proteases. *Biochem. Int.* 3, 457, 1981.
60. Durán, N. e M. Haun, (1986). Quimiluminescence,
bioluminescence and its applicability in medicine.
Ciência e Cultura , no prelo.