UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

ANDERSON GARBUGLIO DE OLIVEIRA

Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos

São Paulo

Data do depósito na CPG:

06/05/2010

ANDERSON GARBUGLIO DE OLIVEIRA

Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para
Obtenção do Título de Doutor em
Química (Química Orgânica)*

Orientador: Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani

São Paulo

2010

ANDERSON GARBUGLIO DE OLIVEIRA

“Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos”

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em
Química Orgânica

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais Silene e Wanderley,
minha irmã Aline,
minhas avós Josepha e Lourdes (in memoriam),
e à minha namorada Tatiana
por todo apoio, carinho e amor,
sem vocês não eu teria conseguido alcançar meus objetivos*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à minha família. Durante todos esses anos eles me apoiaram diversas vezes, de todas as maneiras, seja escutando, dando conselhos, amor e carinho. Com certeza não teria chegado até aqui sem vocês. Gostaria também de dizer muito obrigado a minha namorada Tatiana, que sempre contribuiu muito para que eu me tornasse uma pessoa melhor. Sua paciência, amor e visão clara sempre ajudaram a manter a “fera” calma.

Quanto a minha orientação na USP, sempre disse que fui um aluno privilegiado. Além de conseguir trabalhar em algo que eu sempre achei interessante e multidisciplinar, meu orientador Cassius permitiu que eu pudesse desenvolver minha autoconfiança e principalmente senso crítico durante minha pesquisa. Pude contar com sua ajuda sempre que precisei, não importava quando. Além disso, nas horas vagas, também podia sempre conversar sobre os mais variados assuntos (incluindo bolsa de valores). Dessa maneira, agradeço muito sua orientação e amizade, e espero que possamos estabelecer colaborações no futuro.

Um professor que também muito contribuiu para a minha formação foi o Prof. Etelvino Bechara. Suas histórias envolvendo expedições, experimentos e pesquisadores, e claro, seus vastos conhecimentos químicos e bioquímicos, me inspiraram muito.

Agradeço aos diversos colegas que fiz durante esses anos todos, especialmente Júlio, Fernando, Rita, Adriano, Camila, Dutra, Vanessa, Avishek, Nilson, Douglas, Crislaine, Derisvaldo, Marcelo, Olívia, Adriana, Mônica, Camila, Joey, Lolo, Ana, a todos os novos colegas do laboratório de química ambiental no bloco 8 e a tantos outros que eu conheci brevemente durante esse tempo.

Agradeço também:

Profa. Patrícia Sartorelli (UNIFESP) por toda a importante ajuda com as separações e purificações orgânicas. Profa. Marilene Demasi (Instituto Butantã) por me ajudar com as separações iniciais de proteínas. Profa. Nina Coichev (IQ-USP) pelo uso de seu luminômetro, que me permitiu visualizar pela primeira vez a emissão de luz na minha reação. Prof. Manuel Torresi (IQ-USP) pelo uso de sua *glovebox*. Prof. Catalani (IQ-USP) pelo uso de seu liofilizador e pelos conselhos dados durante minha qualificação juntamente com a Profa. Ana Campa (FCF-USP). Prof. Willy (IQ-USP) pela ajuda em diversas discussões sobre mecanismos e fluorescência. Prof. Massuo Kato (IQ-USP) e sua pós-doutoranda Lydia Yamaguchi por toda atenção e ajuda com minhas separações no HPLC. Prof. Ernani Pinto (IQ-USP) e seu técnico Leonardo pela ajuda nas purificações e MS. Prof. J. W. Hastings e Profa. Thérèse Wilson (Harvard) pela ajuda na confecção dos meus artigos e idéias de ensaios cinéticos. Prof. Vadim Viviani (IB-UFSCar) pela contribuição e discussões sobre sistemas bioluminescentes. Prof. Erick Bastos (UFABC) pela confiança e auxílio no projeto. Prof. Dennis Desjardin (SFSU-Califórnia) por me aceitar como doutorando visitante nos EUA e John Heenan (e família) pela amizade e toda a ajuda durante minha estadia na Califórnia. Capitão do exército Laury de Oliveira por sua grande contribuição na minha formação e agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro. E a todos que de alguma maneira contribuíram! Muito Obrigado!

”אור יהי”

(“que se faça a luz”)

Gen1:3

Resumo

Oliveira, A. G. **“Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos”** 2010. (130p.) Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esta tese descreve como é possível obter emissão de luz *in vitro* enzimaticamente, a partir de extratos quente e frio de diferentes espécies de fungos bioluminescentes, o que indica também um mecanismo comum de bioluminescência em todos esses organismos. Dados cinéticos sugerem um mecanismo enzimático em duas etapas e corroboram a hipótese enzimática de Airth e Foerster, da década de 1960.

Finalmente, utilizando-se extratos quente e frio foi possível também isolar a luciferina fúngica e obter sua massa molecular (298,1837 m/z). Essa substância isolada emite luz enzimaticamente *in vitro*, sendo que a sobreposição do espectro de emissão e do espectro de bioluminescência do fungo confirma que essa substância é a luciferina fúngica.

Palavras-chave: fungos, bioluminescência, luciferina, luciferase.

Abstract

Oliveira, A. G. “**Mechanistic study on fungi bioluminescence**” 2010. (130p.)
PhD Thesis – Graduate Program in Organic Chemistry. Instituto de Química,
Universidade de São Paulo, São Paulo.

This thesis describes how *in vitro* light emission can be enzymatically obtained from the hot and cold extracts assay using different species of fungi, which also indicates a common mechanism of light emission for all these organisms. Kinetic data suggest a consecutive two-step mechanism and corroborate the 1960's enzymatic proposal of Airth and Foerster.

Finally, using hot and cold extracts assay we were also able to purify and to determine the molecular weight of the fungal luciferin (298.1837 m/z). The isolated substance emits light enzymatically *in vitro*, whose light emission spectrum matches with the fungal bioluminescence one thus confirming that the substance is the fungal luciferin.

Keywords: fungi, bioluminescence, luciferin, luciferase.

Sumário

1	Introdução	11
1.1	Bioluminescência geral	11
1.2	Bioluminescência fúngica	16
1.3	Funções ecológicas da bioluminescência em fungos	19
1.4	Mecanismo de bioluminescência em fungos	20
2	Objetivos	27
3	Resultados e discussão	28
3.1	Cultivo e explorações iniciais	28
3.2	Estudo mecanístico: hipóteses enzimática e não-enzimática	37
3.3	Estudos cinéticos	49
3.4	Isolamento e purificação da luciferina fúngica	62
4	Conclusões	94
5	Parte experimental	96
5.1	Preparação de meio de cultura	96
5.2	Explorações iniciais	98
5.2.1	Separação por cromatografia em camada delgada (CCD)	98
5.2.2	Separação por coluna de troca aniônica fraca (DEAE)	99
5.2.3	Separação por extração em fase sólida (SPE)	100
5.2.4	Ensaio de emissão de luz	101
5.2.4.1	Ensaio de Airth e Foerster	101
5.2.4.2	Ensaio de Shimomura	102
5.2.4.3	Ensaio quimiluminescente com KOH	103
5.2.5	Purificação das frações protéicas	103
5.2.5.1	Extração	103
5.2.5.2	SDS – PAGE	104
5.2.5.3	Filtros moleculares de centrifugação	105
5.3	Estudos mecanísticos: hipótese enzimática e não enzimática	106
5.3.1	Extração em fase sólida (SPE)	106
5.3.2	Ensaio de emissão de luz	106
5.3.2.1	Preparação do extrato quente	107
5.3.2.2	Preparação do extrato frio	107
5.3.2.3	Componentes necessários para a emissão de luz	107
5.3.2.4	Emissão de luz utilizando as coenzimas NADH e NADPH	108
5.3.2.5	Emissão de luz do EF obtidas após precipitação com (NH₄)₂SO₄	108
5.3.2.6	Emissão de luz das frações do EF obtidas por filtros moleculares de centrifugação	109
5.3.2.7	Ensaio de Airth e Foerster	109
5.3.2.7.1	Preparação do extrato quente	109
5.3.2.7.2	Preparação do extrato frio	110

5.3.2.7.3	Ensaio de emissão de luz	110
5.4	Estudos cinéticos	110
5.4.1	Preparação do extrato quente/frio	110
5.4.2	Ensaio de emissão de luz	110
5.4.3	Efeitos da adição de dodecanal e FMNH ₂ /FMN	111
5.4.3.1	Preparação da solução de FMNH ₂ e FMN	111
5.4.3.2	Preparação da solução de dodecanal	112
5.4.3.3	Ensaio de emissão de luz	112
5.4.3.4	Reações cruzadas entre <i>G. viridilucens</i> , <i>M. lucentipes</i> e <i>A. bisporus</i>	112
5.4.3.4.1	Preparação do extrato quente/frio	112
5.4.3.4.2	Ensaio de emissão de luz	112
5.5	Isolamento e purificação da luciferina fúngica	113
5.5.1	Separação por cromatografia de troca aniônica	113
5.5.1.1	Preparação do extrato quente/frio	113
5.5.1.2	Cromatografia de troca aniônica	114
5.5.2	Extração acelerada por solvente	114
5.5.2.1	Preparação do extrato quente por ASE	114
5.5.2.2	Preparação do extrato frio	115
5.5.3	Estudo da influência do solvente durante a extração por ASE	115
5.5.3.1	Preparação do extrato quente por ASE	115
5.5.3.2	Preparação do extrato frio	116
5.5.4	Extração quimicamente ativa	116
5.5.5	Extração acelerada com solvente	116
5.5.6	Extração quimicamente ativa	117
5.5.7	Primeira etapa de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	118
5.5.7.1	Espectro de emissão de luz	120
5.5.8	Segunda etapa de separação por HPLC	121
5.5.9	Terceira etapa de separação por HPLC	122
5.5.10	Espectroscopia de massa de alta resolução (HRMS) e espectro de absorção	122
5.5.11	Ressonância magnética nuclear (RMN)	123
6	Referências	124

1 Introdução

1.1 Bioluminescência geral

A emissão de luz por animais e plantas tem inspirado a curiosidade e o interesse da humanidade, sendo alvo de investigações por um grande número de naturalistas, físicos e fisiologistas, desde os tempos de Aristóteles (384-322 a.C.) e Plínio (d.C. 23-79).¹ Robert Boyle (1627-1691) demonstrou que a luminescência de pedaços de carne e madeira dependia de ar, utilizando uma bomba de vácuo por ele mesmo construída. Benjamim Franklin (1706-1790) inicialmente acreditou que a bioluminescência fosse um fenômeno elétrico, entretanto mudou sua opinião quando descobriu que a luz emitida no oceano podia ser filtrada com auxílio de um pedaço de pano. Paolo Panceri (1833-1877) é conhecido por suas publicações da anatomia e histologia de vários tipos de organismos luminosos, e Raphaël Dubois (1849-1877) cunhou os termos luciferina e luciferase. Eilhardt Wiedemann (1888) foi o primeiro a usar o termo “luminescência”, como a emissão de luz fria, e Harvey (1916) usou o termo “bioluminescência”, luminescência proveniente de seres vivos, possivelmente pela primeira vez. Entretanto, os segredos da química da bioluminescência só começaram a serem desvendados no século XX.²

A bioluminescência ocorre sob diversas formas (Figura 1), apresentando vários mecanismos de emissão de luz. Alguns animais têm órgãos luminosos altamente desenvolvidos que se assemelham a olhos, e estão sob o controle do sistema nervoso. Dessa maneira a luminescência é emitida conforme haja necessidade ou por estimulação (peixes e lulas). Em alguns outros, cada célula contém todos os componentes para emissão de luz, e a luz é emitida continuamente (bactérias e fungos).

Figura 1. Alguns exemplos de seres bioluminescentes: (a) vaga-lume *Photinus pyralis*; (b) verme *Diplocardia longa* fotografada sob luz natural e (b1) sob sua própria luz azul; (c) fungo "*Pleurotus*" *gardneri*; (d) baía luminescente na ilha de Vieques (Porto Rico), o dinoflagelado *Pyrocystis lunula* (d1) é responsável pela luz azul; (e) água-viva *Atolla wyvillei* sob luz natural e (e1) emitindo luz; (f) vôngole *Pholas dactylus* emitindo luz azul e (f1) sob luz natural; (g) bactéria *Photobacterium phosphoreum*; (h) peixe diabo *Oneirodes* sp., a bioluminescência nesse peixe deve-se a presença de bactérias bioluminescentes; (i) vaga-lume *Phrixotrix hirtus*.

Existem ainda muitos que são intermediários entre esses dois grupos. O sistema bioluminescente de um organismo pode envolver uma série de reações químicas, embora a luz seja emitida apenas a partir de uma reação que produz um estado excitado do emissor. Apesar de existirem diversas reações de emissão de luz diferentes, todas envolvem a oxidação de um substrato (usualmente chamado de luciferina) que fornece a energia para a geração do estado excitado. Toda bioluminescência é uma reação quimiluminescente.^{2,3}

Algumas peculiaridades são conhecidas no fenômeno da bioluminescência. Uma delas é a distribuição dos organismos bioluminescentes na árvore filogenética. Não há nenhum padrão óbvio ou razão para a distribuição da bioluminescência entre as espécies.² É extraordinário o fato de que uma espécie em um gênero possa ser luminosa e outra proximamente relacionada não apresente bioluminescência. Outra bem conhecida peculiaridade está relacionada ao fato de que um vasto número de seres bioluminescentes são marinhos, em contraste com as poucas espécies terrícolas e de água-doce encontradas. De fato, os organismos bioluminescentes não-marinhos podem ser rapidamente descritos: vaga-lumes, algumas espécies de vermes, o milípede *Luminodesmus sequoiae*, os moluscos *Latia neritoides* e *Quantula striata*, as moscas *Arachnocampa flava* e *Orfelia fultoni* e algumas espécies de fungos.^{2,4}

Considera-se que o moderno estudo da bioluminescência começou quando Dubois demonstrou o primeiro exemplo de reação luciferina/luciferase em 1885. Ele preparou dois extratos a partir dos órgãos luminosos do besouro *Pyrophorus noctilucus*. Um desses extratos foi preparado em água gelada, resultando em uma suspensão luminosa. Essa luminescência decresceu gradualmente e finalmente desapareceu. O outro extrato foi preparado inicialmente usando água quente, o que imediatamente suprimiu a luz, e depois resfriado. Quando extratos quente e frio foram combinados a emissão de luz foi

restabelecida. Dubois também observou o mesmo comportamento utilizando extratos feitos a partir do vôngole *Pholas dactylus*.⁵ Ele concluiu que o extrato frio (EF) era composto por uma fração protéica, termo-lábil, necessária para a emissão de luz que ele chamou de “luciferase”. No extrato quente (EQ), onde as proteínas haviam sido destruídas pelo calor, haveria uma substância relativamente termo-estável que ele designou como “luciférine”. Assim, uma reação luciferina/luciferase, poderia ser vista como uma reação substrato/enzima que resultava em emissão de luz.

O termo luciferina nunca foi precisamente definido. Originalmente, a palavra significou uma substância termo-estável, difusível contida no EQ preparado a partir de órgãos luminosos. Harvey descobriu que a luciferina do vôngole *P. dactylus* diferia da luciferina do ostracóide *Cypridina hilgendorffii*,⁶ e afirmou em seu livro “É provável que as luciferinas e luciferases de diferentes espécies em um grupo possam ser bastante diferentes quimicamente uma das outras”. Harvey foi responsável pelos estudos químicos iniciais da bioluminescência, apesar do fato de que pouco era conhecido a respeito de reações químicas naquela época. Seu livro *Bioluminescence*, publicado em 1952, é considerado a Bíblia da bioluminescência.

No final da década de 1950 sabia-se que a luciferina presente em vagalumes, bactérias e no ostracóide *C. hilgendorffii* eram diferentes. Entretanto em 1960, uma luciferina idêntica a da *C. hilgendorffii* foi descoberta nos peixes luminosos *Parapriacanthus beryciformes* e *Apogon ellioti*. Ademais, durante as décadas de 1970-1980 foi descoberto que a celenterazina (luciferina de águas-vivas) estava presente em diversos organismos luminosos, como celenterados, camarões, lulas e peixes. Baseado nessas informações, parece apropriado definir luciferina como um termo geral para um composto orgânico existente em organismos luminosos, cuja oxidação é responsável pela emissão de luz. Em todos os sistemas conhecidos a reação de oxidação é catalisada por uma

proteína. É importante dizer que a luciferina é capaz de emitir fótons em proporção a sua quantidade sob condições adequadas.^{2, 7} Em alguns pouquíssimos casos conhecidos até hoje, a luciferina pode estar associada a uma outra proteína (não necessariamente uma luciferase), formando um complexo mais estável que os componentes dissociados. A esse complexo é dado o nome de “foto-proteína”. A luz é emitida por uma reação intramolecular da proteína com a luciferina e a quantidade de luz total é proporcional à quantidade de proteína.⁸ Um exemplo desse caso ocorre com a água-viva *Aequorea victoria*.⁹ Uma proteína denominada aequorina extraída dessa água-viva emite luz simplesmente pela adição de íons Ca^{2+} .

Reações bioluminescentes são indispensáveis ferramentas analíticas em vários campos da ciência e tecnologia.² O sistema bioluminescente de vaga-lumes, por exemplo, é usado como um método universal de quantificação de ATP (adenosina trifosfato)³ e foto-proteínas sensíveis a Ca^{2+} , como a aequorina de águas-vivas, são largamente utilizadas no monitoramento intracelular de Ca^{2+} , que regula vários processos biológicos importantes.² Certos análogos da luciferina do ostracóide *C. hilgendorffii* são empregados como sondas para medidas de ânion superóxido, uma importante mas elusiva substância em sistemas biológicos. Proteínas fluorescentes como a GFP (“green fluorescent protein”), extraídas de águas-vivas, são utilizadas como marcadores protéicos no campo da pesquisa biomédica. Todas essas aplicações de sistemas bioluminescentes derivam de estudos químicos da bioluminescência, e de esforços para se entender o fenômeno.^{2,3,10}

1.2 Bioluminescência fúngica

De acordo com Harvey, Aristóteles (384-322 a.C.) foi quem primeiramente descreveu a emissão de luz proveniente de madeiras em decomposição e a distinguiu essa luminescência do fogo.¹ Plínio, o velho, (d.C. 23-79) mencionou em seu *Historia Naturalis*, que um fungo bioluminescente branco, de gosto doce e com propriedades farmacológicas, podia ser encontrado na França. De maneira interessante, G. E. Rumph (1637-1706), um botânico holandês e cônsul de Ambon (Indonésia), descreveu em seu *Herbarium Amboiense*, que nativos eram capazes de iluminar suas trilhas na floresta à noite utilizando fungos bioluminescentes. Harvey também citou o uso incomum de cogumelos luminescentes 200 anos depois de Rumph, na Micronésia, onde nativos usavam esses fungos como ornamentos de cabeça e em danças, ou ainda os esfregavam em seus rostos para assustar inimigos. Curiosamente esses fungos eram freqüentemente destruídos por serem considerados mau presságio.¹

Apesar dos relatos de Aristóteles e Plínio, inicialmente a atenção foi voltada apenas para a luz emitida e não para os fungos. A emissão de luz só foi relacionada aos fungos na primeira metade do século XIX.¹ J. F. Heller (1813-1871), professor da universidade de Viena, foi o primeiro a correlacionar a luz de matéria em decomposição a fungos e bactérias. Uma avaliação moderna desse assunto foi feita por W. Pfeffer (1845-1920),¹ que aplicou os termos luciferina e luciferase, cunhado por Dubois, aos fungos.^{5,11}

Uma grande variedade de fungos bioluminescentes tem sido descoberta nos últimos dois séculos. Existem espécies que emitem luz apenas no píleo, algumas apenas no estipe e outras em ambos, porém todas as espécies bioluminescentes possuem o micélio luminescente (ver Figura 2).

Figura 2. Ilustração das partes comuns de um cogumelo, utilizando como exemplos as espécies *Amanita fulva* e *A. spissa* (adaptado de T. Læssøe¹²).

A cor da luz produzida por todas as espécies de fungos bioluminescentes é similar, com seu máximo de emissão em torno de 530 nm, sugerindo o envolvimento de um emissor comum em todos eles.^{13,14} De acordo com Wassink,¹⁵ até 1978 eram conhecidas cerca de 40 espécies de fungos bioluminescentes. Nosso grupo, em conjunto com o Prof. Dennis E. Desjardin, da San Francisco State University, foi responsável pela última revisão, feita no ano de 2008, expandindo o número de espécies descritas para 71, pertencentes ao menos a três diferentes linhagens: *Omphalotus*, *Armillaria* e *Micenóide*. Desse total de espécies conhecidas no mundo, nosso grupo é responsável por cerca de 20% (Figura 3).¹⁶

Algumas dessas espécies são conhecidas por diversos nomes, o que frequentemente causa confusão durante o processo de identificação. Incertezas se algumas espécies são ou não bioluminescentes também geram dúvidas. Isto pode ocorrer devido ao fato de que a luminosidade da cultura micelial é altamente dependente da composição e condições empregadas. Uma cultura luminosa de fungos bioluminescentes pode tornar-se não

luminescente quando cultivada em condições ligeiramente diferentes. Além disso, certas espécies, como *Panellus stipticus* e *Mycena polygramma*, são conhecidas por existirem em duas formas distintas, uma variedade luminescente e outra não luminescente.¹⁵ No caso do *P. stipticus*, acreditou-se durante muito tempo que a variedade norte-americana fosse luminescente enquanto que a européia não. Entretanto, parece que agora a forma não luminescente também está presente nos EUA.²

Figura 3. Fotografias de quatro diferentes espécies de fungos bioluminescentes descobertos pelo grupo: (a) *Gerronema viridilucens*, (b) *Mycena asterina*, (c) *Mycena fera* e (d) *Mycena lucentipes*, sob iluminação natural e com luz própria, respectivamente.

Fungos luminescentes emitem luz apenas durante certos estágios de seus ciclos de vida. Geralmente, a luminescência é muito mais intensa em corpos de frutificação e micélios jovens, embora sua luminescência possa variar bastante dependendo da espécie e condições ambientais.² A luminescência fúngica não é intensa em comparação com a maioria de outros organismos luminosos. Contudo, a luminescência fúngica é contínua por vários dias, como ocorre com bactérias bioluminescentes. Um cogumelo do fungo *P.*

stipticus pesando 0,2 g, tipicamente emite de $1-2 \times 10^{10}$ fótons por segundo.^{17,18} Assim, a quantidade total de luz emitida durante a vida por um cogumelo luminoso é comparável à emissão de luz por outros organismos, como vaga-lumes e o ostracóide *C. hilgendorffii*.

1.3 Funções ecológicas da bioluminescência em fungos

Diversas hipóteses já foram levantadas sobre qual seria a função para a bioluminescência de fungos. Sivinski¹⁹ propôs que a emissão de luz serviria para atrair invertebrados e assim ajudar na propagação dos esporos. Em um elegante experimento, Sivinski mostrou que mais artrópodes eram atraídos à noite para um frasco de vidro lacrado contendo micélios de fungos bioluminescentes do que para um frasco que continha fungos não luminescentes. O frasco de vidro permitia visualização do conteúdo, mas impedia a liberação de odores. Ademais, pesquisas subsequêntes mostraram que insetos fungívoros eram capazes de perceberem luz na região de 300-650 nm.²⁰ Desse modo, para as espécies que produzem cogumelos bioluminescentes, a emissão de luz seria uma vantagem seletiva sobre as espécies não luminosas, uma vez que poderia atrair artrópodes dispersores de seus esporos. Entretanto, frente ao fato de que fungos luminosos ou não podem produzir milhões de esporos, que são facilmente dispersados pelo vento, a real importância dos insetos nesse processo ainda é desconhecida.²¹ Outra hipótese levantada é a de que a luz emitida seria uma espécie de aviso para predadores de que o fungo é perigoso, já que micélios são uma das maiores fontes de alimentação para uma miríade de insetos.^{22,23} Segundo Lingle^{24,25} e Bermudes e colaboradores²⁶ a bioluminescência em fungos seria uma forma de desintoxicação, principalmente de peróxidos, que são formados principalmente durante a degradação da lignina da madeira. Até onde se sabe todos os fungos bioluminescentes basidiomicetos são capazes de degradar

lignina. De qualquer maneira, a bioluminescência é um processo metabólico dependente de oxigênio. Desjardin e colaboradores acreditam que a bioluminescência é um processo vantajoso que proporciona proteção antioxidante contra efeitos deletérios causados por espécies reativas de oxigênio, produzidas principalmente pela mitocôndria durante a respiração.²¹

1.4 Mecanismo de bioluminescência em fungos

No que se refere ao mecanismo de emissão de luz, o conhecimento da bioluminescência fúngica, descrito até o presente momento, é fragmentado e incompleto, com poucas propostas estruturais para a luciferina fúngica e mecanismo de emissão de luz. Airth e McElroy²⁷ realizaram a primeira tentativa para isolar as substâncias envolvidas em sistemas bioluminescentes de fungos. Posteriormente, Airth e Foerster realizaram diversos experimentos para tentar esclarecer o mecanismo de emissão de luz.²⁸⁻³¹ Duas espécies de fungos bioluminescentes foram estudadas: *Armillaria mellea*, um conhecido fungo patogênico que ataca raízes de plantas, e *Collybia velutipes*. Além de os autores evidenciarem que o processo de emissão de luz dependia de duas enzimas, uma solúvel e dependente de NADPH (portanto uma redutase) e outra de membrana, com função catalítica sobre a emissão de luz (portanto uma luciferase), os autores observaram que as enzimas, bem como os substratos, eram os mesmos para os dois fungos utilizados. Usando *A. mellea* como fonte de substrato e a *C. vellutipes* como fonte das enzimas, foi possível observar emissão de luz.³⁰ O procedimento experimental consistia primeiramente em se preparar um extrato quente com um dos cogumelos secos a fim de se obter a luciferina fúngica. Em seguida, um homogenato com

o outro cogumelo era preparado a frio e fracionado por ultracentrifugação, com o intuito de isolar a redutase, presente na parte solúvel, e a luciferase, presente no precipitado. A emissão de luz podia ser observada quando o extrato quente, contendo a luciferina, era misturado com a redutase na presença de NADPH, seguida da adição da luciferase, após alguns minutos de incubação. Quanto maior o tempo de incubação ou a quantidade de enzima redutase, maior era a intensidade de emissão.³⁰ Nesta proposta, a luciferina fúngica reage inicialmente com uma redutase dependente de NADPH e, em seguida com a luciferase fúngica, resultando na emissão de luz, muito similar ao que ocorre em bactérias (Figura 4).

Bioluminescência de fungos

- Proposta de Airth & Foerster

L: luciferina, LH₂: luciferina reduzida, LO: oxiluciferina

Bioluminescência de bactérias

FMN: flavina mononucleotídeo oxidada (luciferina), FMNH₂: FMN reduzida
RCHO: aldeído alifático de cadeia longa, RCO₂H: ácido graxo

Figura 4. Mecanismo de emissão de luz enzimático proposto por Airth e Foerster durante a década de 1960 e sua comparação com o mecanismo de bioluminescência de bactérias.

Tentativas de se isolar a luciferase por cromatografia, diferença de solubilidade ou fracionamento por (NH₄)₂SO₄ resultavam freqüentemente em purificação insatisfatória ou perda de atividade. Esse comportamento atípico para uma proteína solúvel corroborava a suposição de que a luciferase seria uma proteína insolúvel.³² Tentativas de purificação, empregando centrifugação

por gradiente isopínico foram realizadas, porém com limitado sucesso. Uma micrografia da fração com maior atividade mostrou vesículas de superfície lisa, membranas lineares e certa quantidade de material amorfo de fundo. Entretanto, os autores não puderam identificar se a luciferase estava contida nas vesículas, membranas ou ainda associada a algum outro tipo de organela.³²

Existem ainda muitos grupos de organismos luminosos que permanecem um desafio para cientistas até hoje, dos quais pouco ou quase nada é conhecido a respeito da estrutura de suas luciferinas. Nesses grupos incluem-se bivalves, estrelas-do-mar, lulas, diversos peixes e fungos.³ Com respeito à luciferina fúngica poucos trabalhos foram publicados até hoje e sua estrutura ainda é desconhecida.¹⁶ Isso se deve em grande parte às dificuldades em se provar o envolvimento de enzimas no mecanismo, uma vez que, sem um extrato contendo luciferase fica praticamente impossível ter um ensaio para testar a atividade da luciferina durante sua purificação. Em princípio, deveria ser possível isolar a luciferina ou o produto de sua reação quimiluminescente que possuíisse um espectro de fluorescência idêntico ao de bioluminescência. Isso levaria a uma evidência definitiva da molécula responsável pela emissão de luz. Entretanto, existem fatores que tornam difícil a comprovação da estrutura da luciferina e do emissor em alguns sistemas bioluminescentes. Para que seja possível isolar e identificar a estrutura química de uma luciferina é necessário primeiramente extraí-la e purificá-la. Esse processo envolve geralmente séries de extrações com solventes orgânicos e técnicas cromatográficas diversas. Muitas vezes, as condições empregadas podem ser drásticas e causar modificações químicas na molécula. Ainda, cuidados com a

oxidação e foto-inativação são cruciais. Por fim, a luciferina pura é adicionada aos outros componentes purificados, levando a emissão de luz, muitas vezes visível a olhos nus. A oxiluciferina, o produto de oxidação da luciferina, pode em alguns casos ser isolada também. A identificação estrutural da luciferina/oxiluciferina pode ser feita através de técnicas como UV, IV, fluorescência, espectrometria de massas e por RMN de ^1H e ^{13}C . Além dessas técnicas, a luciferina pode ser sintetizada e depois testada *in vitro*, para demonstrar sua quimiluminescência juntamente com os outros componentes do sistema e, assim, comprovar características físico-químicas semelhantes às da luciferina nativa (cinética, intensidade, cor e rendimento quântico).²

Utilizando esses critérios, algumas famílias de luciferinas foram identificadas até hoje (Figura 5). Elas são: A) aldeídos (alguns vermes), B) imidazolopirazinas (celenterados e ostracóides), C) benzotiazol (vaga-lumes), D) tetrapirróis (dinoflagelados e crustáceos), E) flavina (bactérias) e F) enol-éster (gastrópode – *L. neritoides*).^{3,10}

Figura 5. Alguns exemplos de luciferinas pertencentes às diferentes famílias conhecidas.

Algumas contribuições a respeito do isolamento e propriedades da possível luciferina fúngica foram feitas durante a década de 1960 por Kuwabara e Wassink.³³ Eles isolaram 12 mg de uma substância cristalina e de cor castanha a partir de EQs preparados a partir de 1,3 kg do fungo bioluminescente *Mycena citricolor* desidratado. Essa substância produzia luz enzimaticamente na presença de NADPH e um EF (fonte de enzimas) preparado de acordo com a metodologia de Airth e Foerster.³⁰ Devido a pequena quantidade da substância disponível, apenas algumas de suas propriedades físico-químicas foram determinadas, tais como: absorção em 320 nm, fluorescência em 490 nm, quando excitada em 345 nm e algumas bandas indicando grupos carbonila, obtidas através do espectro de IV.³³ Entretanto, sua estrutura não foi determinada e os próprios autores relataram que seriam necessários mais testes para que se pudesse realmente comprovar seu envolvimento no mecanismo.

Na década de 1970, Endo e colaboradores isolaram quatro novas substâncias a partir dos corpos de frutificação do fungo *Pleurotus japonicus* (antigamente *Lampteromyces japonicus*).³⁴ Entre os compostos isolados, um deles, denominado iludina S, apresenta um espectro de absorção similar ao da substância cristalina obtida por Kuwabara e Wassink.³³ Outra molécula isolada, o ergosta-4,6,8(14),22-en-3-ona, possui um espectro de emissão idêntico ($\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$) ao de bioluminescência de vários fungos.³⁵ A partir desse mesmo fungo, Isobe isolou a riboflavina e a lamptero flavina que possuem espectro de emissão ($\lambda_{\text{max}} = 524 \text{ nm}$) semelhante ao espectro de bioluminescência.³⁶

Figura 6. Alguns exemplos de moléculas isoladas de fungos bioluminescentes.

No final da década de 1980, Nakamura e colaboradores isolaram um sesquiterpeno do cogumelo *P. stipticus* denominado panal e formularam uma nova proposta não enzimática para a bioluminescência fúngica.³⁷ Nesta proposta, o panal é a molécula precursora da luciferina fúngica. Dois outros precursores foram isolados posteriormente, o PS-A e o PS-B, identificados como os ésteres decanóico e dodecanóico do panal, respectivamente.³⁸ O procedimento para a obtenção da luciferina, segundo os autores, consistia em manter o panal de 12 a 16 h na presença de sulfato de amônio ou de uma amina primária e de brometo de cetiltrimetilamônio, em pH 3,7 e a 25°C. Após a adição de $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$, em pH 7-8, observava-se emissão de luz que, dependendo do surfactante, variava de comprimento de onda entre 485-585 nm.¹⁷ O panal é pouco conjugado e bastante flexível, havendo realmente a

necessidade de uma reação de ciclização que o torne mais rígido, para que este possa ser o emissor. Dessa maneira, os autores fazendo uso de reações quimiluminescentes iniciadas por peróxido para medir a atividade, propuseram um mecanismo sem envolvimento de enzimas. Eles encontraram outras substâncias capazes de emitir luz em mais cinco espécies luminescentes, além do fungo *P. stipticus*, e também em espécies não luminescentes. Shimomura não obteve sucesso em demonstrar a presença de uma proteína atuando como catalisador no processo de emissão de luz, assim ele sugeriu que fungos bioluminescentes não continham luciferase.²

Do final da década de 1980 até os dias atuais, nada mais representativo foi publicado com respeito à bioluminescência de fungos, portanto as respostas a várias perguntas relativas ao sistema ainda permanecem um mistério. Adicionalmente, o estudo fundamental da química e bioquímica envolvidos nos sistemas bioluminescentes não atrai mais pesquisadores, como na década de 1960. No último quarto do século XX apenas três estruturas de novas luciferinas foram determinadas, sendo que duas delas são muito similares. Nenhuma foi determinada na última década do século, em contradição com o rápido avanço em técnicas analíticas relacionadas com a aplicação do conhecimento gerado pela bioluminescência.² Segundo Shimomura (um dos laureados com o Prêmio Nobel de Química de 2008, juntamente com Chalfie e Tsien), a maior causa desse declínio seria a transferência do interesse da pesquisa básica de química e bioquímica para a genética/biotecnológica nos últimos vinte anos.

2 Objetivos

Assim, devido às inúmeras dúvidas remanescentes e a grande falta de compreensão ainda básica de como se dá o processo de emissão de luz em fungos, os objetivos desse trabalho foram elaborados de maneira a tentar compreender aspectos chave do mecanismo de emissão de luz. Eles podem ser divididos em quatro partes principais. Inicialmente buscou-se desenvolver condições de cultivos dos fungos luminescentes em laboratório, em meio de ágar e líquido, de maneira a restringir a dependência de coletas feitas na mata como única fonte de material. Com uma quantidade adequada de material, seria possível o estudo do mecanismo de bioluminescência propriamente dito, onde as duas principais (e contraditórias) propostas deveriam ser examinadas: a hipótese enzimática de Airth e Foerster e a não-enzimática, de Shimomura. E, por fim, a partir dos dados obtidos dos ensaios cinéticos poder-se-ia tentar reproduzir a reação bioluminescente *in vitro* e utilizá-la como teste de atividade, para a purificação e identificação da luciferina fúngica.

3 Resultados e discussão

3.1 Cultivo e explorações iniciais

Uma das dificuldades iniciais encontradas no estudo de vários sistemas bioluminescente diz respeito à disponibilidade de material. Obter uma quantidade suficiente de um organismo para a purificação de sua luciferina ou luciferase não é uma tarefa fácil, além disso, as quantidades encontradas desses componentes variam bastante em diferentes espécies.

A cultura disponível em laboratório do fungo *G. viridilucens* foi isolada a partir de corpos de frutificação coletados no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) pela Dra. Marina Capelari, do Instituto de Botânica (IBt) em 2003. Apesar da aparente vantagem do cultivo dos fungos bioluminescentes em laboratório, a quantidade de material gerada é baixa, cerca de 100 mg por placa de 100 mm. Ademais, grande porcentagem da massa de um fungo é composta por água. A solução encontrada para se conseguir uma maior produção foi utilizar os fungos cultivados nas placas como matrizes. Após 20 dias de crescimento, esses fungos são raspados das placas e transferidos para erlenmeyers contendo meio de cultura líquido, onde não há adição de ágar. Nesse meio os fungos formam estruturas circulares, em formatos de ilhas, que emitem luz em sua superfície que está em contato com o oxigênio. Após 15 dias de cultivo, é possível obter em média 3,0 g de material de cada erlenmeyer. Outro ponto positivo que deve ser ressaltado é a menor frequência de contaminação dessas culturas em comparação com as culturas em ágar. Dessa forma, a manutenção de uma cultura auto-sustentável no laboratório possibilitou a obtenção de uma quantidade satisfatória mensal de material, para

o início dos estudos mecanísticos, dependendo pouco do material proveniente de coletas.

Figura 7. Conjunto de imagens ilustrando o processo de cultivo do fungo: desde a coleta de novas espécies na mata (a), passando por sua identificação (b-c) e tentativas de inoculação (d); e finalmente até o cultivo no laboratório em meio de agar (e-h) e líquido (i-m).

Como dito anteriormente, no que tange o mecanismo de emissão de luz, o conhecimento da bioluminescência fúngica, ainda era fragmentado e incompleto. Devido às inúmeras dificuldades no isolamento dos componentes, o sistema bioluminescente fúngico possuía apenas algumas propostas estruturais para a luciferina fúngica e para o mecanismo de emissão de luz, além de ser um dos únicos sistemas no qual ainda não se havia comprovado o envolvimento de enzimas no processo. Obviamente, qualquer mecanismo proposto deve levar em conta todos os reagentes envolvidos, produtos gerados e suas proporções relativas. Assim, com a intenção de se compreender como se dá o processo de emissão de luz em fungos, procurou-se inicialmente isolar os componentes do sistema. Em primeiro lugar, os de natureza não protéica, como a luciferina e oxiluciferina, respectivamente, substrato e produto de oxidação do substrato na reação. Como quase a totalidade das diversas

luciferinas/oxiluciferinas isoladas até hoje apresentam fluorescência, durante as etapas de separação cromatográfica procurou-se por moléculas fluorescentes por volta de 530 nm.

Os primeiros extratos foram preparados com metanol puro, partindo-se de 3,0 g de micélio liofilizado, proveniente de culturas do micélio de *G. viridilucens*. O método escolhido inicialmente para o fracionamento do extrato bruto foi a cromatografia em camada delgada radial (CCD), com auxílio de um aparelho no qual uma placa de CCD circular gira, possibilitando uma melhor separação que o CCD convencional ou cromatografia em coluna. O resíduo de cor amarela, obtido da extração com metanol, foi solubilizado em uma mistura de n-heptano/acetato de etila (5/2) antes de ser aplicado no cromatógrafo radial. Uma parte desse resíduo não se dissolveu na mistura de solventes e foi armazenado. A essa fração foi dado o nome de fração residual polar (RP). Foram coletadas 20 frações, com cerca de 5 mL cada, sendo possível obter por volta de 15 mg de um composto fluorescente sob luz UV em 366 nm, com $R_F = 0,70$ (placa de SiO_2 , 7/3 n-hexano/acetato de etila). Essa substância apresentou um espectro de fluorescência com máximo em 400 nm (λ_{exc} 300 nm). A investigação prosseguiu em seguida com a fração RP. O espectro de fluorescência dessa fração, sem qualquer purificação adicional, apresentou duas bandas, com máximos aproximados em 445 e 523 nm (λ_{exc} 300 nm) respectivamente. Tentativas posteriores de purificação dessas substâncias utilizando CCD radial não se mostraram eficientes, visto que, tanto a pureza quanto a quantidade de material obtido nas frações era insatisfatória. Como alternativa, tentou-se utilizar a metodologia descrita por Shimomura para o isolamento do sesquiterpeno panal.¹⁷ Para tal, preparou-se um extrato, utilizando uma mistura metanol/água 3/7 e 3,0 g de micélio cultivado. O extrato, após partição com acetato de etila, foi evaporado, obtendo-se cerca de 2,7 mg de um resíduo de cor castanho, o qual foi solubilizado em uma mistura

metanol/água e adsorvido em uma coluna de DEAE. As 12 frações coletadas foram eluídas com um gradiente de NaCl e, em seguida, aplicadas em HPLC para verificar seu grau de pureza. Apesar do maior grau de pureza alcançado nas frações, não foi possível isolar a substância fluorescente por HPLC. A molécula fluorescente provavelmente deveria ser muito polar e ionizável, o que tornava sua separação extremamente difícil utilizando uma coluna C18. Foi investigada então uma metodologia alternativa de purificação: a extração em fase sólida. Esse tipo de extração emprega colunas preenchidas com polímeros especiais que possuem maior capacidade de retenção em comparação às colunas C18. Como a molécula de interesse parecia se ionizar, utilizou-se inicialmente uma coluna de troca aniônica forte (Oasis MAX, Waters). O extrato foi preparado com 1,0 g de micélio bruto, usando uma solução metanol/água 3/7 e obtendo-se cerca de 30 mg de resíduo sólido de coloração castanha. Esse resíduo foi solubilizado em água e depois adsorvido na coluna Oasis MAX. As três frações recolhidas da coluna foram analisadas em um espectrofluorímetro, sob excitação em 300 nm, sendo a Fração 2 (vide parte experimental), eluída com metanol puro, a que apresentou maior intensidade de fluorescência, com máximo em torno de 460 nm. Em seguida, essa fração foi aplicada em uma coluna de fase reversa (Oasis HLB) para purificação adicional. As cinco frações recolhidas foram analisadas e, dentre os espectros de fluorescência obtidos, a Fração 2B, com uma banda em 460 nm, pareceu ser a mais pura.

Com o intuito de se obter evidências mais diretas do envolvimento da Fração 2B na bioluminescência de fungos, foram realizados alguns ensaios de emissão de luz. O primeiro ensaio realizado foi o de Airth e Foerster. O procedimento descrito pelos autores foi repetido diversas vezes (vide parte experimental), utilizando-se o micélio do fungo *G. viridilucens* e tentando observar uma possível emissão com auxílio de um contador de fótons. Não

houve registro algum de emissão de luz, resultado similar ao relatado por Shimomura, utilizando o fungo *P. stipticus*.¹⁷ Contudo, diversos fatores, como a labilidade dos componentes, podem ter afetado o resultado. O segundo experimento consistia em reproduzir o ensaio quimiluminescente de Shimomura, utilizado para o panal e seus derivados, com a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$), usando um extrato preparado com o fungo *G. viridilucens* como substrato. Foram realizados também ensaios preliminares com alíquotas da Fração 2B isoladas anteriormente. Os resultados mostraram que havia emissão de luz para o extrato bruto e para Fração 2B, conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8. Quimiluminescência observada após a reação de 50 μL de H_2O_2 (10%) com o extrato bruto de *G. viridilucens* (A) ou a fração 2B (B), seguindo o procedimento descrito por Shimomura (vide parte experimental).

Conforme relatado, o sesquiterpeno panal, depois de ser tratado com sulfato de amônio ou uma amina primária, emite uma maior quantidade de luz, quando submetido à reação de Fenton.¹⁷ Reações de ciclização entre compostos dicarbonílicos (como o panal) e aminas formam muitas vezes

derivados pirrólicos que fluorescem em torno de 460 nm,³⁹ na mesma região em que fluoresce a Fração 2B isolada (λ_{max} 460 nm). A celenterazina (luciferina de alguns organismos marinhos), por exemplo, é uma imidazolpirazina, que também fluoresce nesta região espectral (λ_{max} 465 nm) e emite luz quando dissolvida em solventes polares apróticos na presença de uma base forte.⁴⁰ Tendo em vista o exposto, em um terceiro ensaio quimiluminescente, o extrato bruto foi dissolvido em DMSO, investigando-se a emissão de luz em presença de uma base forte, solução de NaOH 1 M (Figura 9).

Figura 9. Quimiluminescência do extrato bruto em DMSO do micélio de *G. viridilucens*, após adição de 50 μL de NaOH 1M aquoso.

Desta maneira, deu-se continuidade ao isolamento dos componentes do sistema bioluminescente fúngico com a procura de uma molécula fluorescente. Entretanto, como inicialmente não se tinha idéia se a fluorescência vista nos espectros era gerada por uma molécula de baixa massa molar ou então por uma proteína fluorescente, foram feitas purificações visando isolar frações protéicas. Em alguns sistemas, como os de águas-vivas e algumas bactérias

(*P. phosphoreum* e *P. leiognathi*), proteínas fluorescentes podem participar da reação de emissão de luz influenciando na cor final da luz emitida.¹⁰ Assim, preparou-se um extrato a partir de 5 g de micélio fresco e este foi aplicado em uma coluna de afinidade por açúcares (concanavalina A), com o intuito de separar açúcares e proteínas glicosiladas de proteínas não modificadas. A razão pela escolha de uma coluna desse tipo deve-se ao fato de fungos em geral possuírem grandes quantidades de glicoproteínas.⁴¹ Comparando-se os espectros de fluorescência (em 520 nm, com λ_{exc} 440 nm) obtidos da fração retida (glicosilada) e da fração sem afinidade (não-glicosilada), o espectro da fração não-glicosilada mostrava melhor definição da banda em 520 nm (Figura 10), devido a ausência de substâncias que interferem no espectro e que foram retidas na coluna.

Figura 10. Espectro normalizado de emissão (fluorescência) das frações do extrato do fungo *G. viridilucens* recolhidas da coluna de concanavalina A: (—) retida pela coluna e (—) sem afinidade pela coluna.

O trabalho de purificação teve seqüência com a fração não-glicosilada. Deve-se mencionar que, a utilização da coluna de concanavalina A não é suficiente para descartar a presença de açúcares ligados à molécula, pois esta coluna possui afinidade específica somente por açúcares como manose e glicose. A fração eluída da coluna de concanavalina A foi dialisada frente à água durante 24 horas. Com isso, procurou-se retirar substâncias como sais e outras moléculas com massa molecular inferior a 10.000 MWCO. A amostra dialisada foi em seguida analisada quanto à fluorescência, mas não foi possível constatar uma grande variação no espectro de emissão (Figura 11).

Figura 11. Espectro de emissão da fração não-glicosilada obtida a partir da coluna de concanavalina A: (—) não dialisada e (—) após diálise.

Para se verificar se o potencial emissor era realmente uma proteína, uma alíquota da amostra dialisada foi então liofilizada e então aplicada em um aparelho de eletroforese em gel (SDS-PAGE). Foram dissolvidos cerca de 20 mg da amostra em um tampão redutor (240 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,4 g SDS, 0,02% azul de bromofenol, 40% glicerol), em um gel de 10% de poliacrilamida.

Depois da separação eletroforética e revelação com prata (Figura 12), as bandas foram separadas em quatro conjuntos, descoradas e as proteínas extraídas em água. Das quatro frações analisadas, apenas o primeiro conjunto apresentou fluorescência e, mesmo assim, com intensidade próxima ao limite de detecção do aparelho.

Figura 12. Gel de poliacrilamida (10%) da fração não-glicosilada, obtida a partir da coluna de concanavalina A, corado com prata depois de eletroforese. O gel foi dividido em 4 conjuntos para ser analisado por fluorescência.

O primeiro conjunto é o que se difunde entre o gel mais rapidamente, desta forma é composto por proteínas com baixos valores de massa molecular e algumas moléculas orgânicas de caráter não protéico. Foram realizados também experimentos adicionais em gel de acrilamida 12% apenas com o conjunto 1, a fração que apresentou alguma fluorescência, para melhorar o espaçamento entre as bandas, além de eletroforese não desnaturante (nativa). Entretanto, em todas as condições utilizadas, mantendo-se as proteínas nativas ou desnaturadas, não foi possível evidenciar a presença de alguma proteína fluorescente, mesmo que em concentração muito baixa. Deve-se mencionar que, é sabido que proteínas fluorescentes são extremamente resistentes à desnaturação e não perdem a sua capacidade de fluorescer

mesmo sob condições desnaturantes.⁴² Para se relacionar a intensidade de fluorescência obtida no espectrofluorímetro com os valores de massa molecular foram utilizados filtros moleculares de centrifugação, com cortes moleculares nos tamanhos de 10, 30 e 100 kDa. Os resultados mostrados na Figura 13 indicaram que, provavelmente, não se tratava de uma proteína fluorescente, mas sim de uma molécula orgânica com massa molecular bem inferior.

Figura 13. Espectro de emissão corrigido (λ_{exc} em 440 nm) para o extrato bruto do fungo *G. viridilucens* após permeação em diferentes filtros de (A) 10 kDa, (B) controle (extrato centrifugado sem filtro), (C) 100 kDa e (D) 30 kDa.

3.2 Estudo mecanístico: hipóteses enzimática e não-enzimática

Após essas etapas iniciais exploratórias houve um momento de epifania quando se constatou: considerando que fungos bioluminescentes podem conter vários compostos fluorescentes e que o espectro de emissão de algumas delas podem ser similares ao espectro de bioluminescência, uma coincidência espectral é apenas uma condição marginal de que o composto isolado poderia ser o emissor de luz na bioluminescência fúngica. Assim, é

importante demonstrar que um determinado composto isolado está envolvido na reação de emissão de luz.

Como já mencionado, purificações adicionais por SDS-PAGE da fração dialisada, comprovaram que não se tratava de uma proteína. Pode-se explicar o fato de a fluorescência persistir, mesmo após o processo de diálise, pela adsorção de alguma molécula fluorescente às proteínas presentes. Essa molécula poderia ser uma flavina (FMN, vitamina B2, etc.) ou mesmo a oxiluciferina, devido à semelhança do espectro de fluorescência obtido com o espectro de emissão observado *in vivo*. Durante as tentativas iniciais de purificação das enzimas envolvidas no sistema de bactérias bioluminescentes, McElroy observou que não era possível remover toda flavina por diálises ácidas prolongadas ou outros tratamentos, já que testes microbiológicos usando *Lactobacillus casei* mostravam a presença de flavinas mesmo em frações extremamente purificadas.^{43,44}

Portanto, como é bem provável que uma proteína fluorescente não esteja realmente envolvida na bioluminescência de fungos, existiu a necessidade de uma reformulação geral nas propostas anteriores sobre o mecanismo de bioluminescência. Os resultados indicavam que uma molécula orgânica pequena deveria ser a responsável pela emissão, provavelmente com massa molecular inferior a 1000 g/mol, como ocorre nos sistemas bioluminescentes de coleópteros (*P. pyralis*), anelídeos (*D. longa*), dinoflagelados (*Gonyaulax polyedra*), gastrópodes (*L. neritoides*) e em tantos outros.^{2,3,45,46} Dessa forma, o procedimento para isolamento da luciferina fúngica foi alterado.

A primeira modificação efetuada diz respeito à etapa de pré-concentração, na qual foram utilizados filtros de centrifugação com corte

molecular de 10 kDa. O extrato bruto foi preparado a partir de 1,0 g do micélio fresco do fungo *G. viridilucens* em 5,0 mL de água deionizada. O filtrado foi totalmente seco em um concentrador, obtendo-se 120 mg de um resíduo de cor castanha, o qual foi purificado posteriormente em uma coluna WAX (Oasis/Waters). Essa coluna de troca aniônica fraca foi escolhida por ser capaz de separar moléculas com grupos funcionais extremamente ácidos como PO_4^{3-} ou SO_4^{2-} . Coenzimas como FMN, NAD(P)H ou FAD, onipresentes *in vivo*, se encaixam nessa classe de compostos. Assim, as três frações recolhidas da coluna (vide parte experimental) foram analisadas no espectrofluorímetro, sob excitação em 440 nm. Todas as frações apresentaram fluorescência em 530 nm. Entretanto, a Fração 2, eluída com metanol puro, foi a que apresentou a maior intensidade. Essa fração foi totalmente seca e obteve-se um resíduo de cor amarela esverdeada com massa de aproximadamente 0,4 mg (deve-se salientar que partiu-se de 5 mg do resíduo).

Esse sólido, quando exposto à luz UV em 366 nm, emitia forte fluorescência na cor verde, visível a olho nu. Apesar do espectro de fluorescência da Fração 2 ser muito similar ao espectro de bioluminescência do fungo, eram necessárias ainda evidências adicionais para se poder afirmar com segurança se uma molécula presente na fração isolada era realmente o emissor do sistema bioluminescente fúngico. A maneira mais confiável seria estabelecer um ensaio bioluminescente, baseado no sistema fúngico, que levasse à emissão de luz a partir de extratos. Apesar dos resultados obtidos nos ensaios iniciais de emissão de luz de Shimomura e em DMSO serem positivos, ambos os ensaios não são específicos e biocompatíveis. No ensaio de Shimomura, por exemplo, a luz é obtida através da reação de Fenton. Essa

reação gera radical hidroxila, um radical altamente reativo que reage com qualquer molécula próxima a ele, podendo levar a emissão de luz de maneira semelhante ao que ocorre no processo de peroxidação lipídica.³ O ensaio clássico luciferina/luciferase, utilizando os extratos quente-frio e na presença de cofatores, apresenta os resultados *in vitro* mais fidedignos ao que ocorre *in vivo*.

Uma revisão bibliográfica foi feita para tentar compreender possíveis equívocos no protocolo na preparação do ensaio quente-frio descrito por Airth e Foerster.³⁰ É importante ressaltar que todos os sistemas bioluminescentes já estudados requerem uma ou mais proteínas para a produção de luz, restando dúvidas quanto a sua presença somente no caso dos fungos.^{3,10, 47 - 52} A dificuldade em se conseguir reproduzir para fungos o ensaio quente-frio deve-se a alta labilidade da luciferina e até mesmo das enzimas, assim que os extratos são preparados. Tal como ocorre com o ostracóide *C. hilgendorff*⁵³ e com o dinoflagelado *G. polyedra*,⁵⁴ a luciferina, presente no extrato quente, é extremamente lábil e deve sofrer oxidação rapidamente na presença de oxigênio. Problemas adicionais incluem ainda a menor concentração dos componentes nos homogenatos do que as encontradas *in vivo* e a falta de algum cofator necessário para a reação bioluminescente.²⁷

Depois de centenas de tentativas foi possível reproduzir finalmente o ensaio quente-frio *in vitro* para o fungo *G. viridilucens*. O ensaio fundamentou-se na metodologia de Airth e Foerster,³⁰ porém com algumas modificações. O fungo foi primeiramente triturado e liofilizado sob atmosfera inerte de nitrogênio, ficando armazenado em frascos lacrados a -20°C até o momento de seu uso. Caso o extrato quente seja preparado a partir do micélio fresco, a luciferina é

rapidamente oxidada durante o processo de extração e não há emissão de luz. Essa modificação é de vital importância para o sucesso do experimento. Já o extrato frio, contendo as enzimas, foi preparado partindo-se do micélio fresco, pois, neste caso, a quantidade de luciferase deve ser maior do que a quantidade de luciferina ativa, cujo contato com o oxigênio promove sua oxidação. Quando se mistura o extrato quente com o frio não se observa emissão de luz até que se adicione NADH ou NADPH à mistura reacional, situação semelhante a que ocorre no sistema bioluminescente de bactérias. À mistura reacional também foram adicionados 150 mg de BSA, pois sua adição aumenta em cerca de quatro vezes a intensidade de luz. Este efeito potencializador de emissão de luz pela adição de BSA (albumina sérica bovina) foi descrito primeiramente por McElroy e Hastings, durante o processo de purificação das enzimas envolvidas na bioluminescência de vaga-lumes (*P. pyralis*) e bactérias (*P. fischeri* = *Vibrio fischeri*).⁵⁵ Sabe-se que a adição de BSA ou mercaptoetanol ajuda a evitar que proteínas presentes em baixas concentrações desnaturem.⁵⁶

Também não é incomum que a luciferina oxidada ou algum produto de sua degradação atue como inibidor da luciferase. No caso dos vaga-lumes, por exemplo, preparações de extratos brutos, bem como luciferina purificada há muito tempo, podem conter quantidades substanciais de desidroluciferina ou oxiluciferina. Tais compostos têm a capacidade de inibir a luciferase, ligando-se fortemente a ela e diminuindo a intensidade de emissão de luz.² No caso dos fungos, o extrato enzimático, preparado através da precipitação com álcool etílico ou acetona, por diálise, ou ainda na presença de agentes redutores,

mostrou-se inativo no ensaio quente-frio. Apenas a adição de BSA mostrou-se eficaz para estabilizar as luciferase e evitar sua inativação.²⁹

Tendo em vista o exposto, foram investigadas diversas combinações entre o EF e EQ, na presença de NADH, BSA e/ou Tween 20 (um conhecido surfactante neutro e brando, comumente utilizado em sistemas biológicos como estabilizador). Através da análise individual de cada curva da Figura 14 puderam-se obter informações interessantes do papel de cada componente no sistema bioluminescente fúngico.

Figura 14. Curvas de emissão de luz para as seis diferentes combinações de condições para a emissão *in vitro* utilizando o fungo *G. viridilucens* como fonte de extratos.

O mecanismo proposto em 1962 por Airth e Foerster foi baseado no mecanismo de bioluminescência de bactérias. Começando pela de curva número 1, nota-se, que apesar da presença do EF (luciferase), do EQ (luciferina/oxiluciferina) além de BSA, não há emissão alguma de luz. Nesse caso não foi adicionado NADH à mistura reacional. Moléculas como NADH ou NADPH ocorrem naturalmente em células de todos os seres vivos, tendo a função de transportadores de elétrons nas reações de óxido-redução metabólicas. Portanto, a necessidade de NADH ou NADPH para que ocorra emissão de luz indica que a luciferina deve ser reduzida (curvas 3-6). Outra forma para se averiguar a necessidade de uma redutase é repetir o mesmo experimento anterior, porém adicionando NADH, mas sem enzimas, somente com o EQ (luciferina), cujo resultado pode ser visto na curva número 2. Novamente não há emissão de luz, pois, embora haja NADH disponível no meio reacional ele sozinho não é capaz de reduzir o substrato sem o auxílio de uma enzima. Para a curva número 3 omitiu-se o EQ, porém mantendo-se enzimas, BSA e NADH. Neste caso observou-se baixa emissão de luz quando se adicionou NADH à reação. Testes semelhantes realizados em sistemas bioluminescentes bacterianos, também produzem uma baixa quantidade de luz, mesmo sem a adição do EQ, pois pode existir uma pequena quantidade do substrato ainda no EF.³

A maior intensidade de luz foi obtida na curva 6, quando todos os componentes necessários para a emissão de luz estavam presentes: EF, EQ e NADH, além de BSA. A necessidade de BSA (pelo menos nesse estágio de purificação) foi avaliada na curva 4. Quando substrato, enzimas e NADH estão presentes no meio reacional e sem a presença de BSA, a intensidade de luz

gerada é cerca de cinco vezes menor do que quando comparada à melhor condição (curva 6). Para investigar se o efeito causado pela adição de BSA seria apenas de estabilizar as enzimas como no caso de um surfactante brando, foi adicionado Tween 20 (concentração final 0,15% m/v) ao meio reacional ao invés de BSA. O resultado obtido é mostrado na curva 5. Se a única função da BSA fosse semelhante a de um surfactante as intensidades de luz obtidas na curva 5 deveriam ser maiores que na curva 3, visto que no experimento da curva 5 foi adicionado o EQ, enquanto na curva 3 o único substrato presente é o que permaneceu no EF. A real função da BSA em sistemas bioluminescentes ainda é desconhecida, mas efeitos similares também foram descritos em outros sistemas adicionando-se aminoácidos, agentes quelantes ou outras proteínas.⁵⁷⁻⁶⁰ Nesses casos os efeitos foram relacionados à adsorção de um inibidor enzimático ou aos efeitos estéricos não específicos dos reagentes.²⁹ Esses primeiros resultados mostraram que era possível obter luz *in vitro* a partir de extratos do fungo *G. viridilucens* sob condições experimentais apropriadas nas quais o ensaio quente-frio funcionasse

Dando prosseguimento ao estudo do mecanismo, procurou-se entender o comportamento das enzimas envolvidas. Inicialmente decidiu-se verificar se a enzima responsável pela redução do substrato tem especificidade por NADH ou NADPH. Enzimas desse tipo, chamadas oxido-redutases, catalisam reações reversíveis dos seguintes tipos:⁶¹

Desta forma, analisou-se o comportamento do sistema *in vitro* frente à adição de 1,0 mM de NADPH ou NADH como iniciador da reação. Os perfis das curvas de emissão podem ser vistos na Figura 15.

Figura 15. Curvas de emissão de luz para o fungo *G. viridilucens* como fonte de extratos, utilizando como cofator: (A) 1,0 mM NADPH e (B) 1,0 mM NADH.

Os resultados mostram que ambas as coenzimas NADH ou NADPH podem ser utilizadas na emissão de luz, entretanto, quando se usa NADPH a intensidade de luz alcançada é maior. O fato de ser possível obter luz utilizando tanto NADPH como NADH pode ser explicado com base em dados obtidos para as enzimas óxido-redutase presentes em bactérias bioluminescentes. A bactéria bioluminescente *Vibrio harveyi*, por exemplo, possui três classes de óxido-redutase distintas: uma seletiva por NADH, outra por NADPH e a terceira equipotente. Em contraste, a bactéria *V. fischeri* parece possuir apenas uma, igualmente ativa com NADPH e NADH.⁶² Além disso, deve-se ainda levar em conta a possível presença no meio reacional de enzimas denominadas *transidrogenases*, que têm a capacidade catalisar reações do tipo:⁶¹

Desta forma, se, por exemplo, a redutase responsável pela redução do substrato no mecanismo de bioluminescência de fungos fosse específica apenas para NADH ainda seria possível obter luz usando NADPH através da ação de uma transidrogenase. Essas dúvidas poderão ser respondidas no futuro com o fracionamento e purificação do EF. Purificações preliminares foram realizadas com sulfato de amônio, e de acordo com os resultados obtidos existem duas enzimas envolvidas no processo, uma com atividade *redutásica* e outra com atividade *luciferásica*. Essa hipótese foi defendida por Airth e Foerster em 1962, na qual através da ultracentrifugação do EF conseguiu-se demonstrar que o sobrenadante tinha maior atividade redutásica, enquanto o corpo de fundo (fração protéica com maior massa molecular) tinha alta atividade luciferásica. As proteínas do EF foram precipitadas e fracionadas, usando-se faixas de saturação da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com 0-25%, 25-50% e 50-75% (Figura 16).

Figura 16. Curvas de emissão de luz para os ensaios realizados utilizando os precipitados recolhidos nas três faixas de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: (A) 0-25%, (B) 25-50% e (C) 50-75% como fonte enzimática.

Os resultados obtidos com precipitação por sulfato de amônio confirmaram a presença de, ao menos, duas proteínas envolvidas no processo. Isso pode ser inferido primeiramente através dos perfis das curvas. As curvas cinéticas de emissão de luz das frações de 25-50% e 50-75% apresentam comportamento semelhante, de tal forma que a intensidade de luz atinge o máximo rapidamente, seguido de um decaimento mais lento. Uma possível explicação para tal perfil de curva é que, tão logo se adiciona o NADH à mistura reacional o substrato começa a ser reduzido pela redutase e em seguida é oxidado pela luciferase, gerando luz. Dentro de poucos segundos atinge-se o máximo de intensidade de luz, provavelmente devido ao intermediário acumulado (luciferina reduzida - LH_2), pois a segunda reação, com a luciferase, é mais lenta. Caso esta hipótese esteja certa uma das constantes deveria depender da $[\text{NAD(P)H}]$, sendo relacionada com a etapa de

redução, e a outra deveria estar relacionada com a ação da luciferase, possivelmente a etapa lenta do processo de emissão de luz. Seja como for, os experimentos mostram que a intensidade máxima de luz obtida é proporcional à concentração de NAD(P)H. Contudo, o decaimento pode ser causado, além do consumo do substrato pela reação, pela perda de atividade das luciferase devido à ação de inibidores (oxiluciferina ou produtos da reação) ou desnaturação.

A cinética de emissão de luz com a fração que contém o precipitado da faixa 0-25% possui um perfil diferente das outras duas frações. Essa faixa de saturação é caracterizada por precipitar ribossomos, fragmentos de membrana e proteínas com elevada massa molecular.⁶³ Segundo a proposta mecanística de Airth e Foerster a luciferase deveria possuir massa molecular superior a redutase, pois ela pôde ser precipitada por ultracentrifugação, enquanto a redutase não.²⁹ Logo, a fração 0-25%, seguindo essa suposição, deveria conter uma quantidade maior de luciferase que as demais. A curva cinética correspondente a essa fração reforça esta suposição (Figura 16). Nesse caso, a intensidade de emissão de luz aumenta lenta e gradualmente até atingir o máximo. Isso ocorre, pois, o intermediário (LH₂) não se acumula, e dessa maneira todo substrato reduzido disponível é prontamente oxidado pela luciferase.

Dando continuidade ao estudo das enzimas do extrato frio, tentou-se ter uma noção das massas moleculares da redutase e da luciferase, utilizando para tal filtros moleculares de 35 e 100 kDa. Os filtrados obtidos dos filtros de 35 e 100 kDa foram utilizados como fonte de enzimas nos ensaios. Um extrato bruto não submetido aos filtros foi utilizado como controle. O luminômetro não

detectou qualquer emissão de luz nos ensaios com os extratos que passaram pelos filtros (Figura 17). Sendo assim, chega-se a conclusão de que pelo menos uma das enzimas (redutase ou luciferase) deve possuir massa molecular superior a 100 kDa.

Figura 17. Curvas de emissão de luz para o extrato do fungo *G. viridilucens*, utilizando o ensaio quente-frio com para os filtrados recolhidos: (A) controle (extrato bruto centrifugado sem filtro), (B) 30 kDa e (C) 100 kDa.

3.3 Estudos cinéticos

Um dos pontos de maior divergência no mecanismo de bioluminescência de fungos sempre foi a existência ou não de enzimas envolvidas no processo. Em vista dos últimos experimentos favorecerem o envolvimento de enzimas na bioluminescência fúngica, deu-se continuidade ao estudo, baseando-se na proposta mecanística de Airth e Foerster. Inicialmente foram determinados os efeitos nas cinéticas de emissão de luz, variando-se a concentração do extrato quente (EQ), extrato frio (EF) e NADPH.

Foram preparados EQs e EFs conforme detalhados na parte experimental. O efeito da concentração foi estudado variando-se inicialmente a concentração do EQ, usando alíquotas de 2,5, 5, 10, 25 e 50 μL e mantendo-se constantes as concentrações de EF e NADPH. Para determinação dos valores das constantes foram utilizados os gráficos de emissão de luz ajustados de acordo com a seguinte expressão matemática:

$$I_{BL} = A_1 e^{-k_{d1}} + A_2 e^{-k_{d2}} - A_3 e^{-k_f}$$

A expressão mostra que a intensidade de bioluminescência (I_{BL}) é uma função de duas constantes de decaimento (k_{d1} e k_{d2}) e uma constante de formação (k_f), multiplicadas pelos respectivos fatores de intensidade (A_1 - A_3). Os resultados obtidos mostram que os valores das constantes de velocidade não variam com a concentração de EQ (substrato/luciferina), porém, a quantidade total de luz emitida (dada pela integral da curva) é diretamente proporcional a quantidade de EQ, como seria de se esperar em uma reação enzimática com cinética de pseudo-primeira ordem em função da concentração da enzima (Figura 18). A primeira constante de decaimento, $k_{d1} = (5,3 \pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, é 3 vezes maior do que a segunda constante de decaimento, $k_{d2} = (1,6 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e a constante de formação $k_f = (3,8 \pm 0,5) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ é cerca de 7 e 24 vezes maior do que as constantes de decaimento, respectivamente (Tabela 1).

Figura 18: Influência da variação do extrato quente no perfil de intensidade da luz emitida. Condições padrão de reação, EF: 200 μL , $[\text{BSA}]_{\text{final}}$: 150 μg e $[\text{NADPH}]_{\text{final}}$: 100 μM , fungo *G. viridilucens*.

Tabela 1: Efeito da concentração de EQ nas constantes de decaimento (k_{d1} e k_{d2}), formação (k_f) e na integral da intensidade de luz relativa (I_{total} , medida de 0 a 900 s).

volume EQ (μL)	$k_{d1} \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_{d2} \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_f \times 10^{-2} (\text{s}^{-1})$	I_{total}
2,5	$4,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,2$	1
5	$5,5 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,1$	1,9
10	$4,9 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,1$	2,8
25	$5,6 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,1$	5,3
50	$5,3 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,1$	8,2

Estudou-se a cinética de emissão de luz variando-se a concentração de EF, com alíquotas de 25, 50, 100 e 200 μL e mantendo-se os demais componentes constantes. Os resultados mostraram que ambas as constantes, de formação e de decaimento, dependem da concentração do EF, como pode

ser observado pela Figura 19 e Tabela 2. A constante de decaimento (k_d) é linearmente dependente [$I_{BL} = 0,00132[EF] + 2,5 \times 10^{-5}$, ($r = 0,9946$)], enquanto que a constante de formação (k_f) mostra um comportamento de saturação [$I_{BL} = -0,038e^{-0,011[EF]}$, $r^2 = 0,9919$] como pode ser visto na inserção da Figura 19. De forma interessante, as curvas obtidas utilizando 25 e 50 μ L de EF foram ajustadas utilizando a seguinte expressão: $I_{BL} = A_1e^{-k_{d1}} - A_2e^{-k_f}$, enquanto que para 100 e 200 μ L a expressão utilizada foi a mesma utilizada na Figura 18 acima.

Assumindo que a k_f é relacionada com a redução da luciferina pela ação da enzima redutase dependente de NADPH e as constantes de decaimento, relacionadas com a ação da luciferase, parece que existem dois caminhos distintos levando a emissão de luz pela luciferase. Um deles (relacionado a k_{d2} , a constante de menor valor) parece ter relevância apenas em maiores concentrações de enzimas, ou seja, em baixas concentrações de enzima a curva de intensidade de luz vs. tempo pode ser ajustada com apenas uma constante de decaimento. É importante salientar que, as frações protéicas utilizadas não foram ainda purificadas e, portanto, podem conter impurezas que influenciam no perfil de emissão de luz. Espera-se que as dúvidas relacionadas com a dependência das constantes possam ser esclarecidas no futuro. Contudo, esses resultados são de grande importância, pois não há qualquer tipo de estudo cinético desse tipo disponível na literatura para a bioluminescência fúngica.

Figura 19: Influência da variação do extrato frio no perfil de intensidade da luz emitida. *Inserção*: comportamento das constantes de formação (k_f) e decaimento (k_d) em relação a quantidade de extrato frio. Condições padrão de reação, EQ: 50 μL , $[\text{BSA}]_{\text{final}}$: 150 μg e $[\text{NADPH}]_{\text{final}}$: 100 μM , fungo *G. viridilucens*.

Tabela 2: Efeito da concentração de EF nas constantes de decaimento (k_{d1} e k_{d2}), formação (k_f) e na integral da intensidade de luz relativa (I_{total} , medida de 0 a 9000 s).

volume EF (μL)	$k_{d1} \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_{d2} \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_f \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	I_{total}
25	$2,3 \pm 0,3$	-	$8,5 \pm 0,5$	1,0
50	$2,5 \pm 0,1$	-	$14,9 \pm 0,4$	1,5
100	$4,0 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,5$	$26,1 \pm 0,5$	1,3
200	$6,4 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,2$	$32,5 \pm 0,4$	1,6

Quanto a influência da concentração do NADPH, foram testadas as seguintes concentrações finais: 5, 10, 20, 50 e 100 μM e os resultados obtidos são ilustrados na Figura 20. Pode-se notar claramente que k_d mantém-se praticamente constante com as alterações da $[\text{NADPH}]$, enquanto que k_f

aumenta. Nota-se também que, a quantidade total de luz emitida é dependente da concentração de NADPH. Esses resultados podem ser interpretados como uma corroboração da hipótese defendida de que o NADPH é uma coenzima envolvida no mecanismo de bioluminescência. Esse comportamento demonstrado no consumo de NADPH em fungos é análogo ao que acontece em bactérias bioluminescentes, nas quais a constante de decaimento é independente da concentração de NADPH, mas depende da concentração e do *turnover* das enzimas (luciferase e redutase).⁶⁴

Figura 20: (A) Efeito da variação da concentração de NADPH no valor das constantes de decaimento (k_d) e formação (k_f) da reação de emissão de luz. (B) Influência da concentração de NADPH na quantidade total de luz emitida. Condições padrão de reação, EF: 200 μL , EQ: 50 μL e $[\text{BSA}]_{\text{final}}$: 150 μg , fungo *G. viridilucens*.

Esse conjunto de resultados legitimiza a hipótese enzimática defendida por Airth e Foerster da década de 1960. Ainda, segundo Airth e Foerster, existiriam ao menos duas enzimas envolvidas no processo de emissão de luz em fungos; uma proteína solúvel [uma redutase, dependente de NAD(P)H] e uma proteína insolúvel, catalisadora da formação da luciferina no estado excitado (luciferase).³² Desta forma, essas enzimas poderiam ser separadas através do uso de ultracentrifugação. Sendo assim, foram preparados os EQ e EF a partir do fungo *G. viridilucens* liofilizado, conforme descrito nos

procedimentos experimentais. O EF foi obtido do ultracentrifugado a $198.000 \times g$, durante 60 min a 4°C . Utilizando metodologia similar a de Airth,³⁰ foi possível separar do EF o sobrenadante (fração solúvel) e o pellet (fração insolúvel). O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma seringa e o pellet foi re-dissolvido no tampão de extração, contendo 250 mM de sacarose. Nesse caso, a sacarose tem a função de estabilizar as estruturas de membrana a qual a luciferase pode estar ligada.

Experimentos de emissão de luz, utilizando essas duas frações protéicas, mostram resultados interessantes. Foram adicionados ao tubo do luminômetro, nessa ordem de adição, 50 μL de uma solução (1 mg/mL) de BSA, 50 μL de extrato quente e 50 μL de uma solução 0,7 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL do sobrenadante, aos 60 s, e depois de 20 s (80 s no total) foram adicionados os 100 μL do pellet. O experimento foi realizado novamente, alterando-se a ordem da adição, de modo com que o pellet fosse acrescentado primeiro e depois o sobrenadante. (Figura 21)

Pode-se notar claramente que a ordem da adição influencia a cinética da reação. Provavelmente, essa variação na cinética ocorre porque quando a fração solúvel (redutase) foi adicionada inicialmente, há um breve tempo de acumulação do substrato (luciferina) sob sua forma reduzida, que, depois, é rapidamente consumida, quando se adiciona a fração insolúvel (luciferase, Figura 21A). Quando a ordem de adição é invertida, qualquer molécula de luciferina sob a forma reduzida, encontrada no meio reacional, é prontamente oxidada pela luciferase (pellet) levando a emissão de luz. Porém, a redução e, por conseguinte, a produção de mais substrato reduzido para a luciferase não ocorre até que haja a adição da redutase (sobrenadante), levando a uma

cinética mais lenta que no primeiro caso (Figura 21B). Além disso, nota-se que, necessariamente, ambas as frações foram requeridas para que a emissão luz máxima fosse alcançada. Esses resultados corroboram a hipótese de Airth e Foerster do envolvimento de ao menos duas enzimas distintas no mecanismo de produção de luz em fungos.

Figura 21: Efeito da ordem de adição de sobrenadante e pellet, separados do EF, na cinética de emissão de luz. No experimento A foi adicionado o sobrenadante e depois o pellet, no experimento B, o pellet e depois o sobrenadante. Condições padrão de reação, EQ: 50 μ L, [BSA]_{final}: 150 μ g e [NADPH]_{final}: 100 μ M, fungo *G. viridilucens*.

O fato de a luciferase ser uma proteína de membrana explicaria sua elevada labilidade durante processos de purificação, bem como o papel da BSA nos ensaios *in vitro*. A adição de BSA, feita rotineiramente durante os ensaios, eleva a intensidade de luz em cerca de quatro vezes. Esse efeito poderia estar relacionado a algum tipo de associação entre BSA e luciferase, aumentando a solubilidade e estabilidade dessa última, de forma similar aos descritos para a luciferase de vaga-lumes e bactérias.⁶⁵

Até agora os resultados obtidos apontam a presença de uma redutase solúvel, dependente de NAD(P)H, atuando em conjunto de uma luciferase, possivelmente de membrana, mostrando uma intrigante similaridade com o mecanismo de bioluminescência bacteriana. Em bactérias, o processo de emissão de luz depende ainda, além das enzimas já citadas, de um aldeído de cadeia longa (com 8 a 16 átomos de carbono) e FMN (flavina mononucleotídeo).⁶⁴ Dessa forma, testou-se também o efeito da adição de FMN/FMNH₂ e dodecanal no comportamento da emissão de luz no sistema fúngico, porém, não se evidenciou aumento ou inibição da luz emitida para os três compostos testados durante os ensaios. Experimentos dessa mesma natureza feitos por Airth em 1961 também mostraram resultados semelhantes.²⁹

Existem diferentes sistemas bioluminescentes conhecidos, todavia todos eles utilizam uma luciferase e uma luciferina, as quais apresentam reatividade inter-espécie.⁶⁶ Como todas as espécies de fungos bioluminescentes conhecidas emitem luz por volta de 530 nm, seria muito importante verificar se o mecanismo de bioluminescência envolvido também é o mesmo. Sendo assim, foram feitos experimentos de reações cruzadas a partir de três espécies diferentes: *G. viridilucens* e *M. lucentipes* (bioluminescentes) e *Agaricus bisporus* (não bioluminescente, popularmente conhecido como “*champignon*”). O tipo de reação padrão utilizado foi o ensaio de Dubois. A Tabela 3 mostra as combinações realizadas e os resultados obtidos.

Tabela 3: Sumário das reações cruzadas realizadas com o ensaio padrão entre três espécies de fungos .

reação	fonte do EQ	fonte do EF	emissão de luz ^a
1	<i>G. viridilucens</i>	<i>G. viridilucens</i>	sim
2	<i>M. lucentipes</i>	<i>M. lucentipes</i>	sim
3	<i>G. viridilucens</i>	<i>M. lucentipes</i>	sim
4	<i>M. lucentipes</i>	<i>G. viridilucens</i>	sim
5	<i>A. bisporus</i>	<i>A. bisporus</i>	não
6	<i>G. viridilucens</i>	<i>A. bisporus</i>	não
7	<i>A. bisporus</i>	<i>G. viridilucens</i>	não

Foi possível obter emissão de luz empregando o ensaio padrão partir de extratos do fungo *M. lucentipes*, o que indica a possibilidade dessa espécie apresentar a mesma hipótese enzimática de emissão de luz e possuir, além de luciferina, as demais enzimas responsáveis pela bioluminescência. Portanto, para que se pudesse confirmar tal hipótese, foram preparados EQs e EFs a partir de *G. viridilucens* e *M. lucentipes*. Os resultados obtidos (reações 3 e 4) mostraram que tanto as enzimas quanto a luciferina dos fungos *G. viridilucens* e *M. lucentipes* puderam ser intercambiadas na reação e, ainda assim, foi possível obter emissão de luz. Experimentos similares (reações 5, 6 e 7) foram realizados também a partir de extratos do fungo não bioluminescente *A. bisporus* com a finalidade de controle. De fato, não houve qualquer emissão de luz registrada pelo luminômetro. Esse resultado é interessante do ponto de vista que legitima a metodologia empregada para determinação de luz, pois demonstra a necessidade de fatores corretos para que possa haver emissão de luz. Além disso, pode-se inferir que a espécie *A. bisporus* não possui luciferina, nem qualquer enzima necessária no processo de bioluminescência.

No laboratório do Prof. Dr. Dennis Desjardin, da San Francisco State University, EUA, foram disponibilizadas mais 8 espécies de fungos: 5 espécies

bioluminescentes (*Armillaria mellea*, *Omphalotus olivascens*, *Mycena fera*, *M. citricolor*, *M. luxperpetua*) e 3 não bioluminescentes para controle (*Filoboletus gracilis*, *M. singeri*, *M. nivicola*). Somando-se a essas 8 espécies, mais 3 espécies bioluminescentes brasileiras (*G. viridilucens*, *M. luxaeterna* e *P. gardneri*) foram adicionadas, sendo possível realizar reações cruzadas com todas as 4 linhagens conhecidas de fungos bioluminescentes: *Armillaria*, *Omphalotus*, *Micenóide* e *Gerronema*. A Tabela 4 e a Figura 22 mostram todas as combinações e resultados obtidos.

Tabela 4: reações cruzadas utilizando uma espécie de cada uma das 4 linhagens de fungos bioluminescentes conhecidas (*Armillaria*, *Omphalotus*, *Micenóide* e *Gerronema*) e uma espécie controle não bioluminescente (*F. gracilis*).

reação	fonte do EQ	fonte do EF	emissão de luz
1	<i>A. mellea</i>	<i>A. mellea</i>	sim
2	<i>M. luxaeterna</i>	<i>A. mellea</i>	sim
3	<i>O. olivascens</i>	<i>A. mellea</i>	não
4	<i>G. viridilucens</i>	<i>A. mellea</i>	sim
5	<i>F. gracilis</i>	<i>A. mellea</i>	não
6	<i>P. gardneri</i>	<i>A. mellea</i>	sim
7	<i>A. mellea</i>	<i>M. luxaeterna</i>	sim
8	<i>M. luxaeterna</i>	<i>M. luxaeterna</i>	sim
9	<i>O. olivascens</i>	<i>M. luxaeterna</i>	não
10	<i>G. viridilucens</i>	<i>M. luxaeterna</i>	sim
11	<i>F. gracilis</i>	<i>M. luxaeterna</i>	não
12	<i>P. gardneri</i>	<i>M. luxaeterna</i>	sim
13	<i>A. mellea</i>	<i>O. olivascens</i>	não
14	<i>M. luxaeterna</i>	<i>O. olivascens</i>	sim
15	<i>O. olivascens</i>	<i>O. olivascens</i>	não
16	<i>G. viridilucens</i>	<i>O. olivascens</i>	não
17	<i>F. gracilis</i>	<i>O. olivascens</i>	não
18	<i>P. gardneri</i>	<i>O. olivascens</i>	sim
19	<i>A. mellea</i>	<i>G. viridilucens</i>	sim
20	<i>M. luxaeterna</i>	<i>G. viridilucens</i>	sim
21	<i>O. olivascens</i>	<i>G. viridilucens</i>	não
22	<i>G. viridilucens</i>	<i>G. viridilucens</i>	sim
23	<i>F. gracilis</i>	<i>G. viridilucens</i>	não
24	<i>P. gardneri</i>	<i>G. viridilucens</i>	sim
25	<i>A. mellea</i>	<i>F. gracilis</i>	não
26	<i>M. luxaeterna</i>	<i>F. gracilis</i>	não
27	<i>O. olivascens</i>	<i>F. gracilis</i>	não
28	<i>G. viridilucens</i>	<i>F. gracilis</i>	não
29	<i>F. gracilis</i>	<i>F. gracilis</i>	não
30	<i>P. gardneri</i>	<i>F. gracilis</i>	não

Figura 22: Curvas de emissão de luz para todas as combinações de espécies descritas na Tabela 4.

Tabela 5: reações cruzadas utilizando quatro espécies bioluminescentes da linhagem *Micenóide* (*M. fera*, *M. citricolor*, *M. luxperpetua* e *M.luxaeterna*) e duas espécies não bioluminescentes como controle (*M. singeri* e *M. nivicola*) também da mesma linhagem.

reação	fonte do EQ	fonte do EF	emissão de luz
1	<i>M. fera</i>	<i>M. luxaeterna</i>	sim
2	<i>M. citricolor</i>	<i>M. luxaeterna</i>	sim
3	<i>M. luxperpetua</i>	<i>M. luxaeterna</i>	sim
4	<i>M. singeri</i>	<i>M. luxaeterna</i>	não
5	<i>M. luxaeterna</i>	<i>M. singeri</i>	não
6	<i>M. nivicola</i>	<i>M. luxaeterna</i>	não
7	<i>M. luxaeterna</i>	<i>M. nivicola</i>	não

Figura 23: Curvas de emissão de luz para todas as combinações de espécies descritas na Tabela 5.

Como resultado imediato (Tabela 4), vê-se que todas as espécies bioluminescentes dentro das 4 diferentes linhagens emitem luz quando cruzadas entre si. A dificuldade em se obter luz utilizando-se a espécie *O. olivascens* deve-se ao fato da cultura dessa espécie em particular ter apresentado emissão de luz muito baixa. Para que seja possível observar emissão de luz *in vitro* é necessário que a cultura tenha uma emissão de luz adequada. Contudo, utilizando-se *P. gardneri* como fonte de luciferina, que também pertence a mesma linhagem evolutiva de *O. olivascens*, foi possível obter emissão de luz. Como controle na Tabela 4 foi utilizado o fungo *F. gracilis*. Quando esse fungo foi utilizado como fonte de EQ ou EF nenhuma emissão de luz foi observada e têm-se as mesmas conclusões da tabela 3. A Tabela 5 mostra os ensaios dentro de uma ramificação da linhagem *Micenóide* com *M. singeri* e *M. nivicola*, que não são bioluminescentes, mas são

filogeneticamente muito próximos às espécies bioluminescentes *M. fera*, *M. citricolor*, *M. luxperpetua*. Escolheu-se testar *M. luxaeterna* frente às demais espécies de *micenas* disponíveis, devido a sua intensa luminosidade e grande quantidade disponível no laboratório. Novamente, a luz só foi registrada em ensaios entre espécies bioluminescentes. Assim, apesar de *M. singeri* e *M. nivicola* estarem muito próximos evolutivamente das outras *micenas* bioluminescentes, esses dois fungos não contêm luciferina e nem as enzimas necessárias para que ocorra a emissão de luz. O isolamento da luciferina e das enzimas envolvidas na bioluminescência fúngica poderá fornecer importantes informações para responder a essas perguntas.

3.4 Isolamento e purificação da luciferina fúngica

Tendo em vista os últimos avanços alcançados para a compreensão do mecanismo de bioluminescência e a disponibilidade de um ensaio enzimático confiável a partir de extratos, prosseguiu-se com a purificação da luciferina fúngica. Corpos de frutificação do fungo *P. gardneri* foram utilizados como material de partida para o isolamento. Os cogumelos foram secos usando cloreto de cálcio, moídos e guardados sob atmosfera de argônio em tubos lacrados. Testes preliminares mostraram que essa espécie de fungo também é ativa empregando-se o ensaio de Dubois (tanto como fonte de EF quanto EQ) e, a julgar pela intensidade de luz obtida, contém maior quantidade de luciferina por massa de material quando comparada com *G. viridilucens* e *M. lucentipes*. Para a preparação do ensaio de Dubois cerca de 100 mg do fungo *P. gardneri* seco foram dissolvidos em 3,5 mL de tampão de extração e utilizado como fonte de luciferina (EQ). As enzimas foram extraídas utilizando-se 80 mg do

micélio cultivado em laboratório do fungo *G. viridilucens* em 4 mL de tampão. Ambos os extratos foram preparados conforme metodologia descrita na parte experimental.

O EQ obtido foi injetado em uma coluna de DEAE de troca aniônica fraca com auxílio de seringa. A amostra foi então eluída com 20 mL de tampão fosfato (10 mM, pH 7,5), contendo 5 mM de mercaptoetanol. Em seguida, foi eluído um gradiente de NaCl de 0 a 1M a partir de mais 20 mL do mesmo tampão. Foram coletadas 20 frações de 2 mL, e cada uma delas foi testada quanto a presença de proteínas e atividade através do ensaio de Dubois. Os resultados da cromatografia de troca aniônica são mostrados na Figura 24.

Figura 24: Purificação da luciferina a partir do EQ do fungo *P. gardneri* através de coluna de troca aniônica de DEAE. A partir de 20 mL eluídos foi iniciado um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M. A atividade emissão de luz (□) foi determinada através do ensaio de Dubois e a concentração das proteínas (○) foi determinada em 280 nm.

De acordo com o perfil cromatográfico obtido, a separação não foi eficiente, visto que, além do pico correspondente a luciferina (frações 14, 15 e 16) percebe-se que uma grande quantidade de proteína foi co-eluída. Porém, no que diz respeito à natureza da molécula de luciferina, interessantes observações podem ser obtidas do cromatograma. Inicialmente, nos primeiros 20 mL, foram eluídas moléculas pequenas e macromoléculas que tem pouca ou mesmo nenhuma afinidade pelos grupos dietilaminoetil presentes no recheio da coluna de DEAE. Espécies positivamente carregadas nesse pH e certas moléculas neutras, retidas fracamente por efeito de fase reversa encaixam-se neste perfil. Quando o gradiente é iniciado, os íons cloreto competem pelos grupos dietilaminoetil da coluna, substituindo as espécies negativamente carregadas que possuem alta afinidade pela coluna. O pico de atividade da luciferina foi encontrado nas frações 14, 15 e 16, eluídas durante o gradiente de NaCl. Desta forma, pode-se deduzir que a molécula de luciferina é capaz de sofrer ionização, apresentando carga negativa em pH 7,5, pois ela interage com o recheio positivamente carregado da coluna e sua remoção ocorre apenas com o início do gradiente. Moléculas com um grupo funcional ácido carboxílico poderiam encaixar-se nesse perfil de comportamento.

A presença de um ácido carboxílico na luciferina ajudaria a estabelecer uma metodologia de separação mais eficiente e também explicaria alguns resultados históricos. Em 1966, Kuwabara e Wassinki isolaram uma substância cristalina do fungo *Mycena citricolor*. Esse composto era capaz de servir como substrato para a reação enzimática proposta por Airth, levando a emissão de luz. Para isolar essa substância os autores utilizaram na época, dentre várias técnicas, diversas extrações quimicamente ativas. Dessa maneira, alterando o

pH da solução de 8,5 para 3, Kuwabara e Wassinki tornavam a substância ativa, antes apenas solúvel em água, solúvel em solventes orgânicos. Esse tipo de comportamento é típico de ácidos carboxílicos. Apesar da estrutura nunca ter sido determinada, espectros de infravermelho da amostra sugeriam a presença de grupos carbonílicos devido as bandas em 1570, 1600 e 3500 cm^{-1}

1 33

Outro ponto analisado durante o processo de cromatografia por troca aniônica foi o rendimento. Através das intensidades de emissão de luz obtidas pelo ensaio de Dubois com o extrato quente antes e depois da cromatografia pôde-se evidenciar que cerca de mais de 90% da atividade da luciferina foi perdida durante o processo de purificação. De modo geral, a purificação e caracterização da luciferina em diversos sistemas torna-se difícil não apenas pela quantidade relativamente pequena disponível, mas também por sua alta instabilidade em todos os graus de pureza.⁶⁷ Como a remoção de oxigênio da solução retarda sua inativação, assume-se que essa perda de atividade seja devido à sua oxidação não enzimática.

Foi investigada, então, uma metodologia alternativa para a purificação da luciferina, utilizando um aparelho de extração acelerada por solvente (Accelerated Solvent Extraction, ASE 300, Dionex). Esse tipo de técnica reduz significativamente o tempo de extração, aumentando a eficiência da interação sólido/líquido a altas pressões e temperaturas. O N_2 injetado sob alta pressão mantém o solvente no estado líquido durante o processo e a temperatura mais alta propicia uma diminuição na viscosidade, o que facilita sua penetração na matriz.⁶⁸

A cela de extração do aparelho ASE 300 foi carregada com 10 g de corpos de frutificação secos e moídos do fungo *P. gardneri*, misturados previamente com 10 g de sílica. Adicionalmente, uma pequena camada contendo 5 g de sílica pura foi adicionada previamente à cela de extração. A sílica favorece o *clean-up* da amostra, além de evitar que a expansão da amostra seca de corpos de frutificação durante a hidratação cause obstrução da cela. Em seguida, procedeu-se com o programa de extração do aparelho (vide parte experimental), preenchendo a cela com o solvente (água deionizada saturada com nitrogênio), a 80°C sob 1500 psi. O tempo de extração, quantidade de material e temperatura foram escolhidos após várias tentativas, verificando-se a atividade do extrato obtido através do ensaio de Dubois, sendo a programação usada a que se mostrou mais eficiente. Cerca de 90 mL de extrato filtrado foram recolhidos em um frasco lacrado (previamente cheio com argônio) com septo e uma alíquota foi retirada para análise de atividade.

Em seguida, estudou-se a influência do solvente utilizado durante a extração. Normalmente dá-se preferência a extração utilizando solventes orgânicos, pois eles desnaturam as enzimas responsáveis pela bioluminescência sem a necessidade de altas temperaturas.² Quando as enzimas são inativadas a luz é suprimida instantaneamente e dessa maneira o consumo de luciferina cessa. Porém, tentativas utilizando alguns solventes orgânicos no extrator ASE 300 não foram satisfatórias, sendo a água deionizada a 80°C o solvente que demonstrou o melhor resultado, em concordância com os resultados de Airth e Foerster. Os autores, durante a década de 1960, realizaram experimentos para verificar a solubilidade do substrato (luciferina) contido no extrato quente. Utilizando o fungo *Armillarea*

mellea seco, eles prepararam vários extratos com diferentes solventes. Em seguida, o solvente era completamente evaporado e o resíduo obtido era solubilizado em tampão fosfato quente (0,1 M, pH 7,5, contendo 5 mM de EDTA e 1 mM de mercaptoetanol), resfriado novamente, e, então, era testada sua atividade frente a um extrato enzimático. Resultados preliminares mostraram que a luciferina não seria solúvel em acetona, clorofórmio, dietil éter, dietil éter/etanol (3:1), *n*-butanol e benzeno, mas apenas em água. Dessa maneira, foi utilizada inicialmente água deionizada como solvente.

A alta temperatura interrompe o processo de oxidação da luciferina pela luciferase, mas por outro lado, tem a desvantagem de aumentar a velocidade de oxidação não enzimática. Uma alternativa para esse efeito indesejável foi dada por Harvey em 1919.⁶⁹ Ele demonstrou que, acidificando o extrato contendo luciferina do ostracóide *Cypridina hilgendorff*, o processo de degradação tornava-se extremamente lento, sendo possível inclusive ferver uma solução contendo essa luciferina durante 30 min sem apreciável perda de atividade. De maneira geral, na maioria dos sistemas bioluminescentes estudados, esse efeito pode ser observado, sendo exceções para dinoflagelados e penatulários.^{67,70}

Portanto, verificou-se o efeito na atividade de emissão de luz usando água deionizada acidificada (pH 3) durante o processo de extração por ASE. Foram preparadas duas soluções: i) tampão fosfato 10 mM e ii) solução 0,025% de HCOOH. Alíquotas de cada extrato foram retiradas para a verificação da intensidade de emissão de luz usando o ensaio padrão. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 25. Como a quantidade de luz emitida depende da concentração de luciferina, pode-se ver facilmente que o

processo de extração em meio ácido traz benefícios. Além disso, é interessante ressaltar também a grande diferença entre a emissão de luz alcançada quando se comparam as duas soluções ácidas, uma vez que ambas as soluções foram ajustadas para pH 3,0. Assim sendo, não só a acidez foi responsável por diminuir a oxidação não enzimática. Provavelmente, esse efeito se deve ao fato de que o ácido fórmico pode atuar como um agente redutor moderado, assim mantendo o meio levemente reduzido.⁷¹

Figura 25. Influência do solvente de extração na intensidade de emissão de luz final obtida no extrato quente, utilizando o ensaio padrão: (A) água deionizada, (B) tampão fosfato 10 mM, pH 3,0 e (C) solução 0,025% de HCOOH, pH 3,0.

Se além do meio ácido a presença de um agente redutor aumenta a quantidade final de luciferina ativa durante a extração, julgou-se interessante testar também a influência de outro agente redutor mais forte, o mercaptoetanol. Foram realizadas mais algumas extrações, adicionando-se diferentes concentrações de mercaptoetanol à solução de extração (solução

0,025% HCOOH, pH 3,0). Pode-se comprovar que a adição de 20 mM de mercaptoetanol na solução durante o processo de extração aumenta de forma significativa a quantidade de luz obtida quando comparada com a solução que não foi adicionado mercaptoetanol (Figura 26).

Figura 26. Influência do solvente de extração na intensidade de emissão de luz final obtida no extrato quente, utilizando o ensaio padrão: (B) solução 0,025% de HCOOH, pH 3,0, (A) solução 0,025% de HCOOH, pH 3,0, contendo 20 mM de mercaptoetanol.

Concentrações de mercaptoetanol até 20 mM estimulam a emissão de luz, porém, acima desse valor o agente redutor começa a influenciar negativamente no desempenho do ensaio padrão, diminuindo a intensidade de luz emitida. Provavelmente isso ocorre devido ao fato do mercaptoetanol ser um álcool, que, em elevadas concentrações, poderia desnaturar as enzimas responsáveis pela bioluminescência. Dessa maneira, em vista dos resultados satisfatórios obtidos, foi estabelecido como solvente de extração água deionizada, contendo 0,025% de HCOOH e 20 mM de mercaptoetanol.

Definidas as especificações de extração deu-se prosseguimento a purificação da possível luciferina fúngica. Tentativas de separação anteriores por coluna de DEAE mostraram que a luciferina presente no extrato quente era retida na coluna. O recheio dessas colunas é composto por um polímero funcionalizado com grupos dietilaminoetil (DEAE), que estão positivamente carregados em pH inferiores a 11,50. Assim, dependendo do pH do tampão eluente utilizado, substâncias negativamente carregadas nesse pH ficam retiradas na coluna, enquanto moléculas neutras e positivamente carregadas são eluídas. O fato de a luciferina ficar retida na coluna com tampão fosfato pH 7,0 mostrou que a luciferina deveria estar dissociada neste pH. Se o pH do tampão é reduzido para 3,0 a luciferina é eluída. A dissociação nessa faixa de pH é característico de ácidos carboxílicos.

Em vista dos resultados mostrados na coluna de DEAE e partindo-se da hipótese de que a luciferina podia possuir um grupo funcional ácido carboxílico, então, em pH 3,0, ela deveria estar neutra e, dessa maneira, tornar-se solúvel em um solvente orgânico. Assim, optou-se por fazer uma extração quimicamente ativa (ou extração líquido-líquido), como uma etapa de pré-purificação, ao invés de aplicar o extrato bruto proveniente do ASE diretamente na coluna de DEAE. Essa etapa é interessante, pois a quantidade de luciferina presente no extrato é extremamente baixa ao contrário da quantidade de impurezas.

O extrato obtido do equipamento ASE 300, utilizando água contendo 0,025% de HCOOH (pH 3,0) e 20 mM de mercaptoetanol teve seu pH ajustado para 3,0 (quando necessário) e foi extraído com acetato de etila. Nesse pH a luciferina não está dissociada, o que diminui sua solubilidade em água e,

portanto, aumenta sua afinidade pelo acetato de etila significativamente. Testes utilizando o ensaio padrão mostraram que a atividade da fase aquosa depois da extração era cerca de 95% menor quando comparada com o extrato bruto, sendo assim, essa fase foi descartada. Em seguida lavou-se a fase orgânica com água deionizada para retirar o excesso de ácido e reduziu-se o volume de solvente em cerca de 1/3 do inicial. O extrato orgânico concentrado foi extraído com água contendo 5% de NaHCO_3 , pH 8,0. Nesse pH a luciferina deveria estar dissociada e, portanto, solúvel na fase aquosa. Na fase orgânica restariam compostos menos polares. Depois da separação foram retiradas alíquotas da fase aquosa, e os resultados obtidos pelo ensaio padrão indicaram grande atividade. A fase orgânica, por sua vez, foi totalmente evaporada e o resíduo final foi dissolvido em tampão de extração e analisada pelo ensaio padrão. A intensidade de emissão de luz obtida foi próxima aos limites do controle, portanto, essa fase foi desprezada. É necessário salientar que todo o processo de extração foi feito sob atmosfera de nitrogênio ultrapuro e sob banho de gelo, quando possível.

Nesse estágio de purificação seria possível reduzir o volume de água por roto-evaporação e, assim, concentrar a luciferina antes de aplicá-la à coluna. Porém, esse processo necessita de aquecimento para que água possa ser retirada. Foram feitas algumas tentativas, mas em todas elas a atividade do extrato decaiu muito no final, provavelmente devido à decomposição da luciferina. Uma saída simples encontrada foi acidificar novamente a fase orgânica e extraí-la novamente com três porções de acetato de etila. A fase orgânica foi então evaporada rapidamente à temperatura ambiente e o resíduo

obtido foi dissolvido em 2,0 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7,0, contendo 20 mM de mercaptoetanol para testes de atividade.

É interessante notar que, a partir das curvas de emissão de luz é possível observar uma sensível mudança no perfil cinético durante as diferentes etapas de purificação. Conforme a luciferina é purificada em cada etapa, a velocidade da reação torna-se mais lenta e alcança intensidades de luz cada vez menores. Ainda, quando se tenta concentrar a solução de luciferina diluindo-a em um volume inferior para se obter maiores intensidades de luz, o resultado é uma emissão de luz mais baixa ainda. Esse efeito inesperado pode ser explicado baseado em observações feitas por Shimomura durante a purificação da luciferina do gastrópode *Latia neritoides*.⁵⁰ Segundo o autor, no processo de purificação de uma luciferina é de se esperar que uma quantidade desse substrato, em uma dada preparação, seja proporcional à quantidade de luz total emitida numa reação com a luciferase. Porém, alguns fatores podem distorcer essa proporção. A presença de agentes supressores e dos produtos de oxidação da luciferina podem causar tais efeitos. McElroy e Bitler também notaram tais efeitos enquanto tentavam purificar a luciferina de vaga-lumes.⁷² A maioria das preparações de luciferina cristalina de vaga-lumes, que possuem um altíssimo grau de pureza, produzem uma intensidade máxima de luminescência geralmente menor que a observada para um extrato de luciferina cru, sem qualquer purificação. A razão para essa diferença não é inteiramente clara, entretanto, parece estar relacionada aos produtos de oxidação não enzimática da luciferina. Normalmente, a luciferina oxidada atua como um potente inibidor da reação, diminuindo sua eficiência sensivelmente.

Para Shimomura esses erros podem ser minimizados preparando-se uma solução altamente diluída da luciferina.⁵⁰ Em seguida, testa-se a emissão de luz dessa solução com uma preparação contendo luciferase em grande quantidade. A luciferina é consumida rapidamente nessa reação e a quantidade de luz emitida pode ser comparada a outras preparações ou frações de interesse. Esse efeito de diluição é muito útil, principalmente quando se está verificando a atividade de diversas frações retiradas de uma coluna. Nesses casos é necessário ler-se a emissão de luz rapidamente de cada frasco coletado, pois, caso a cinética de emissão seja muito lenta, será necessário um tempo muito maior de leitura. Essa demora pode levar a um perfil de atividade equívoco, uma vez que é praticamente impossível evitar que a luciferina sofra degradação não enzimática. Alguns testes preliminares de diluição foram realizados com extrato final obtido a partir das extrações líquido-líquido. As curvas de emissão de luz obtidas são mostradas na Figura 27.

Figura 27. Influência do efeito da diluição do extrato final na intensidade de emissão de luz, utilizando o ensaio padrão: (F) branco [sem extrato final], (E) extrato final sem diluição, (B) diluição 10x, (A) diluição 20x, (C) diluição 50x e (D) diluição 100x.

Sem dúvida, tem-se uma confirmação experimental para os efeitos de diminuição da velocidade observados anteriormente. Inicialmente essa preparação pode conter uma grande quantidade de luciferina ou mesmo agentes supressores e inibidores. Conforme se aumenta o fator de diluição da luciferina, mantendo-se constante a quantidade de enzimas, a velocidade e a intensidade de luz também aumentam. Porém para fatores de diluição superiores a 20 vezes a intensidade de luz torna a diminuir novamente. Dessa maneira, existe uma faixa adequada em que essa diluição pode ser utilizada para favorecer a luciferina sem que haja o comprometimento do ensaio.

Dentre as várias dificuldades encontradas durante a purificação da possível luciferina fúngica, deve-se destacar sua diminuta concentração presente *in vivo*. Esse fato limita sua detecção apenas por técnicas suficientemente sensíveis como luminescência e alguns tipos de fluorescência. Sistemas bioluminescentes de vaga-lumes e águas-vivas são exemplos clássicos de quão ínfima pode ser a quantidade de luciferina encontrada nesses seres vivos. A luciferina de vaga-lumes foi isolada pela primeira vez por McElroy em 1959, a partir de 15.000 vaga-lumes. O autor obteve como rendimento apenas 9 mg de material puro.⁷² Shimomura, por sua vez, purificou 1 mg de celenterazina a partir de 2,5 toneladas de águas-vivas em 1969.⁹ Assim, com o intuito de superar essa dificuldade deu-se continuidade ao processo de separação e purificação da possível luciferina fúngica, partindo-se de uma quantidade maior de material. Dessa maneira, foram utilizados 300 g de cogumelos secos do fungo *P. gardneri*, o que representa cerca de 3,0 kg de cogumelos frescos.

Inicialmente, esses 300 g de material foram triturados com auxílio de um liquidificador e divididos em 30 porções contendo 10 g do fungo triturado além de mais 10 g de Celite® (marca registrada da Merck para farinha de diatomácea) em cada cartucho de extração. O extrato bruto (3,0 L) teve seu pH ajustado para 3,0 utilizando uma solução de HCl 6,0 M e em seguida foi dividido em 6 porções de 0,5 L cada, para facilitar a etapa de extração quimicamente ativa. Inicialmente cada porção de 0,5 L foi extraída com acetato de etila. Durante essa primeira etapa de extração com acetato de etila, há a formação de uma forte emulsão tornando praticamente impossível visualizar a separação entre as fases. Esse fato é agravado pela facilidade de oxidação da luciferina, o que torna proibitivo manter a mistura no funil de separação por muito tempo, até que se possa verificar a separação. Adições de NaCl à mistura não acarretaram melhora na separação. A única maneira encontrada foi dividir a mistura contendo as duas fases em tubos do tipo *Falcon*® (Corning) e centrifugar. A mistura toda foi centrifugada a $9.000 \times g$ durante 2 min e 20°C. A fase orgânica, localizada na parte superior do tubo, foi retirada com auxílio de pipetas Pasteur e rapidamente transferida para um frasco lacrado e mantido sob banho de gelo seco/etanol. A fase aquosa foi transferida novamente para o funil de extração e todo processo de extração foi repetido mais duas vezes. Assim, cada porção de 0,5 L foi extraída com acetato de etila, totalizando, aproximadamente, 3,0 L de fase orgânica, onde estaria presente quase a totalidade da possível luciferina fúngica. Ao final do processo a fase aquosa foi descartada.

Um rotaevaporador foi utilizado para reduzir o volume da fase orgânica (3,0 L) até aproximadamente 0,5 L. Para se tentar evitar ao máximo o processo

de oxidação da possível luciferina contida na fase orgânica, a evaporação foi realizada à temperatura ambiente e foi adicionado cerca de 0,5 mL de mercaptoetanol como agente antioxidante. Por fim, também foi conectada ao rotaevaporador uma linha de gás nitrogênio ultrapuro para se evitar ao máximo o contato da amostra com o oxigênio. A fase orgânica final apresentou cor marrom avermelhada.

Essa fase foi então levada até o funil de separação e extraída com uma solução de NaHCO_3 5%, pH 8,0. Nessa etapa houve uma boa separação entre as fases, não havendo necessidade, portanto, de centrifugação. Como a possível luciferina fúngica deve conter um grupo funcional ácido carboxílico, a molécula deve estar com carga negativa neste pH (8,0) e, portanto, solúvel na fase aquosa. A fase aquosa total obtida (cor fortemente amarelada, cerca de 0,5 L) foi reservada e a fase orgânica descartada. Para a última etapa de extração, a fase aquosa anterior teve seu pH ajustado para 3,0, utilizando um a solução 6,0 M de HCl, e em seguida, foi extraída com acetato de etila. A nova fase orgânica obtida foi totalmente seca e re-dissolvida em 10 mL de uma solução aquosa pH 3,0 (0,025% HCOOH), contendo 2 mM de mercaptoetanol. Esse extrato final foi dividido em dois frascos lacrados (5 mL cada), sob atmosfera de nitrogênio, e mantidos sob refrigeração a -20°C . A fase aquosa foi descartada. Um esquema de todo o processo de separação do extrato bruto é mostrado na Figura 28.

Figura 28. Fluxograma ilustrativo do processo de isolamento e purificação até o extrato final pré-purificado.

Para a continuação do processo de purificação, o extrato final obtido (cerca de 4 mL) foi aplicado em alíquotas de 20 μ L em um HPLC com sistemas

de detecção por UV/Vis e fluorescência. A fase móvel empregada (fluxo 2 mL/min) para a separação no HPLC foi composta por dois solventes: a) água deionizada contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol e b) acetonitrila contendo HCOOH (0,025%) e 2 mM de mercaptoetanol. Como uma coluna de fase reversa foi utilizada, a fase móvel deve ter pH baixo para que os ácidos contidos no extrato estejam protonados e possam interagir com a coluna adequadamente por mecanismo de fase reversa. Do contrário, eles teriam mais afinidade pelo solvente do que pela coluna e não haveria separação dos compostos.

Inicialmente, como não se tinha idéia do grau de pureza nem da quantidade de compostos presentes no extrato final foi utilizado um gradiente exploratório, dividido por etapas, na seguinte proporção: i) 97/3 A/B de 0 a 10 min, ii) 85/15 A/B de 10 a 20 min e iii) 50/50 A/B de 20 a 30 min (Figura 29). Para o sistema de detecção foi empregado um detector de UV/vis ajustado em 254 nm, porém, por se tratar de um detector de arranjo de diodos, existe a possibilidade de se varrer qualquer outro comprimento de onda na faixa de 210-500 nm simultaneamente. Em conjunto, foi utilizado também um detector de fluorescência configurado em λ_{exc} 345 nm e λ_{em} 500 nm, ganho 100 e atenuação 16. Os comprimentos de onda para a excitação foram baseados no trabalho de Kuwabara e Wassink. Os autores isolaram em 1966 uma substância cristalina a partir do fungo *M. citricolor*, que possuía uma banda de absorção no UV em 320 nm e emitia luz na presença de um extrato enzimático preparado com descrito por Airth e Foerster.³³ Essa substância fluorescia em 490-500 nm, quando excitada em 345 nm. Dessa maneira, como não foi possível ainda determinar o espectro de absorção para a possível luciferina

fúngica, devido a sua purificação apenas parcial, torna-se difícil definir exatamente os melhores comprimentos de onda de excitação e emissão.

Figura 29: Cromatograma obtido após a injeção de 20 μL no HPLC do extrato final pré-purificado, proveniente da extração quimicamente ativa, monitorado por absorção no UV em 254 nm (—) e fluorescência, $\lambda_{\text{excitação}}$: 345 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$: 490 nm (- -).

Pelo cromatograma nota-se uma grande quantidade de compostos remanescentes, apesar das etapas de pré-purificação. Para localizar a possível luciferina fúngica, dividiu-se o intervalo de separação cromatográfica em três regiões i, ii e iii conforme Figura 29. Cada uma das frações foi extraída com acetato de etila e as fases orgânicas foram evaporadas e re-dissolvidas em 500 μL de tampão de extração (conforme parte experimental) para que se pudesse verificar a emissão de luz em cada uma delas. Se a fração coletada do HPLC for diretamente utilizado no ensaio padrão, a acetonitrila ou outros solventes orgânicos presentes podem diminuir bastante a eficiência da emissão de luz. Segundo Shimomura, concentrações de solventes orgânicos não devem

exceder 5% do total, do contrário a possibilidade de inibição da reação é muito elevada.²

Os resultados alcançados foram surpreendentes, uma vez que a fração ii mostrou atividade frente ao ensaio padrão. As curvas de atividade obtidas podem ser vistas na Figura 30.

Figura 30: Curvas de emissão de luz obtidas utilizando o ensaio padrão, para as três frações (i, ii, iii) recolhidas do HPLC. Fração i (A), fração ii, (B) e fração iii (C).

Apesar de a fração iii ser a única a possuir um pico com fluorescência, não houve qualquer sinal de atividade quimiluminescente nela, já a fração ii (ativa) não apresentou qualquer fluorescência. Entretanto, o fato de ii não ser fluorescente, pelo menos nesse estágio de purificação, pode ser causado por diversos motivos. Hori e Cormier notaram que, mesmo durante várias etapas de purificação, a luciferina do cnidário *Renilla reniformis* não fluorescia. Segundo os pesquisadores, isso se devia a existência de moléculas contaminantes que atuavam como agentes supressores. Uma dessas moléculas era a desoxiadenosina, que possui forte absorção em 260 nm.⁷³

Além disso, outro fator que também pode influenciar bastante é o pH. A luciferina de vaga-lumes é fluorescente em 537 nm, tanto em condições ácidas ou básicas, embora sua intensidade de fluorescência seja menor em soluções ácidas do que básicas.² Dessa maneira, ainda serão necessários estudos com a luciferina fúngica purificada para que se possa realmente determinar seu espectro de emissão.

Continuando o processo de purificação, foram injetados 20 μ L do extrato final no HPLC e dividiu-se o intervalo de 10 a 20 min, que contém a possível luciferina fúngica, em três frações: a (10-13 min), b (13-16 min) e c (16-20 min), de acordo com a Figura 31. As três frações foram coletadas e, em seguida, extraídas com acetato de etila, de maneira semelhante às frações i, ii e iii. Depois de re-dissolvidas em tampão de extração foram testadas quanto à emissão de luz.

Figura 31: Cromatograma obtido após a injeção de 20 μ L no HPLC do extrato final, monitorado por absorção no UV em 254 nm (—) e fluorescência, $\lambda_{\text{excitação}}$: 345 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$: 490 nm (—). O intervalo de 10 a 20 min foi dividido em três frações: a (10 a 13 min), b (13 a 16 min) e c (16 a 20 min) para ensaios de atividade.

Curiosamente, duas frações apresentaram atividade: b e c. Esse comportamento só poderia ter ocorrido devido a duas possibilidades distintas: a) se o pico correspondente a luciferina estivesse dividido entre os intervalos b e c ou b) a luciferina não está sendo eluída de maneira uniforme, como em um pico, e está sendo “arrastada” de maneira irregular durante esse intervalo. A hipótese “b” poderia ser causada pelo fato da luciferina não estar totalmente protonada nesse pH e ser eluída em equilíbrio com sua parte ionizada. Porém, verificando atentamente o cromatograma da Figura 31, nota-se que existe um pico dividido entre os dois intervalos b e c (marcado com um asterisco). Se a hipótese “a” estivesse correta, então esse pico concentraria toda a atividade e o restante do intervalo b e c não deveria apresentar atividade alguma. A figura 32 ilustra as curvas de emissão de luz desse experimento.

Figura 32: Curvas de emissão de luz obtidas utilizando o ensaio padrão, para o pico localizado em torno de 16 min (A) e todo o restante do intervalo b e c (B).

Os resultados desse experimento apontam para que o pico dividido entre b e c possa ser realmente devido a possível luciferina fúngica. Analisando o espectro de absorção desse pico com auxílio do detector por arranjo de diodos do HPLC é possível notar duas bandas de absorção. Todavia, é interessante notar que esse espectro de absorção tem grande semelhança com o espectro de absorção de duas biomoléculas muito conhecidas: NADPH e NADH (Figura 33).

Figura 33: Comparação entre os espectros de absorção de uma solução (0,5mg/mL) de NADPH (A) e do pico com tempo de retenção em 16 min (B).

Para que se pudesse comprovar se esse pico representava a luciferina fúngica ou seriam simplesmente NAD(P)H presentes no extrato, foram injetados no HPLC 20 μ L de uma solução padrão de NADPH e de NADH. Foram utilizadas condições idênticas às empregadas para a separação do pico que apresentou atividade de emissão de luz (Figura 34). Se as soluções padrões de NADPH e NADH fossem eluídas no mesmo tempo de retenção do

pico da possível luciferina, em torno de 16 min, isso seria um forte indicativo de que aquele pico corresponderia a NADPH ou NADH.

Figura 34: Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após a injeção no HPLC de 20 μ L do extrato final (—) e 20 μ L de duas soluções padrões (0,5mg/mL) de: NADPH (—) e NADH (—). As amostras foram monitoradas por absorção no UV em 254 nm. O quadro destacado na figura representa uma ampliação da área selecionada.

Pode-se notar a grande diferença entre os tempos de retenção dos padrões de NADPH/NADH e o pico que possui atividade de emissão de luz (16 min). Portanto, apesar das semelhanças no espectro de absorção vista anteriormente, a substância detectada não é nenhuma das coenzimas citadas.

Deu-se continuidade então à purificação da possível luciferina fúngica contida no pico com tempo de retenção em 16 min. Para tanto, foram feitas três injeções do extrato final no HPLC e coletadas fase móvel correspondente à região de interesse. As três frações coletadas foram reunidas e extraídas com acetato de etila, conforme descrito anteriormente. A fase orgânica foi totalmente evaporada e dissolvida em 200 μ L de uma solução aquosa

contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol. Essa nova fração, a qual foi denominada luciferina parcialmente purificada, foi re-injetada (20 μ L) no HPLC para uma purificação mais fina. A separação foi monitorada em 254 nm e 350 nm. Esse último comprimento de onda (350 nm) foi escolhido baseando-se no espectro de absorção obtido anteriormente. Mantiveram-se as mesmas condições utilizadas para a detecção por fluorescência já descrita. Foram utilizados os mesmos equipamentos, coluna e fluxo de separação. A única alteração foi feita com relação à proporção de solventes A/B usados na fase móvel. O melhor resultado foi obtido utilizando uma separação isocrática de 90/10 A/B. Tentativas de separação utilizando gradientes não levaram a resultados satisfatórios (Figura 35).

Figura 35: Cromatograma obtido após a injeção de 20 μ L no HPLC do pico em 16 min, monitorado por absorção no UV em 350 nm (—) e fluorescência, $\lambda_{\text{excitação}}$: 345 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$: 490 nm (- -).

O único pico que apresentou espectro de absorção semelhante ao descrito anteriormente é o que possui tempo de retenção em torno de 10 min (marcado com asterisco na Figura 35). Porém, para que se pudesse determinar com certeza se esse pico era realmente a possível luciferina fúngica, foram coletadas alíquotas para o ensaio padrão. Os resultados dos ensaios corroboram as suspeitas sobre a substância com tempo de retenção em 10 min. Nenhum outro pico analisado no cromatograma mostrou atividade. Além disso, um fato que corrobora que essa substância seja mesmo a luciferina fúngica é a grande similaridade entre seu espectro de emissão de luz e a bioluminescência do fungo. Foi feito um ensaio padrão, porém triplicando-se o valor das alíquotas utilizadas (conforme descrito na parte experimental) para que se pudesse preencher a cela de 1,5 mL do espectrofluorímetro (em modo de luminescência) e a quantidade de luz emitida pela reação pudesse ser maior. A luz emitida possui um máximo em 538 nm muito similar à luz emitida pelo fungo (Figura 36).

Figura 36: Comparação entre os espectros de bioluminescência do fungo *G. viridilucens* (A) e a emissão de luz *in vitro* da luciferina purificada (B).

Dessa maneira, essa separação foi realizada num total de 40 vezes e o pico em 10 min foi coletado e evaporado. O resíduo obtido foi dissolvido em cerca de 1,5 mL de uma solução aquosa contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol.

Prosseguiu-se com a purificação da luciferina no HPLC e os melhores resultados na separação foram conseguidos, desta vez, empregando-se gradientes, ao invés de métodos isocráticos. A melhor condição foi alcançada em 20 min de corrida, empregando-se acetonitrila/água, ambos contendo 0,025% de HCOOH. Variou-se a concentração de acetonitrila de 10% até 40%, no intervalo de 0 a 15 min, e de 40% até 80%, no intervalo de 15 min a 20 min. Utilizou-se uma coluna mais longa do que a usada na primeira separação, de 250 mm de comprimento, o que também contribuiu no aumento da resolução. A separação foi monitorada em 280 nm e 320 nm (Figura 37). Todos os picos foram coletados e a atividade de todos eles foi testada individualmente, utilizando-se o ensaio padrão, de maneira similar ao descrito para a primeira separação.

Figura 37: Cromatograma obtido após a injeção de 50 μL no HPLC do pico obtido em 10 min (proveniente da primeira separação), monitorado por absorção no UV em 280 nm (A) e 320 nm (B). A inserção mostra a área ampliada onde está o pico correspondente a luciferina, indicado pelo asterisco.

Esse procedimento de separação foi repetido cerca de 30 vezes até que todos os 1,5 mL da separação anterior fossem injetados. O pico relativo à luciferina, marcado com o asterisco na Figura 36 (em 13 min), foi coletado durante esse processo. Novamente, o solvente da fração coletada foi rotaevaporado e o resíduo re-dissolvido em 1,0 mL de uma solução aquosa contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol. Esse material obtido foi então submetido a uma terceira de separação em HPLC. Durante a primeira injeção (50 μL) foi possível visualizar, pelo número de picos obtidos, que ainda restavam algumas impurezas presentes. Tentativas usando diferentes misturas de acetonitrila/água, sejam no modo isocrático ou gradiente, não levaram a nenhuma separação satisfatória.

A solução foi encontrada ao se substituir a acetonitrila por metanol na fase orgânica. Uma separação satisfatória foi conseguida utilizando-se como fase móvel uma mistura metanol/água, contendo 0,025% de HCOOH, na proporção 4/6. Mais uma vez todos os picos foram testados quanto à atividade de emissão de luz com o auxílio do ensaio padrão. A substância eluída em aproximadamente 17 min continha a luciferina fúngica, enquanto que todas as demais não apresentaram atividade. A luciferina pôde ser facilmente localizada durante a purificação nesse estágio, pois é o pico que apresenta a maior absorção em 365 nm, conforme Figura 38.

Figura 38: Cromatograma obtido após a injeção de 50 μ L no HPLC do pico obtido em 13 min (proveniente da segunda separação), monitorado por absorção no UV em 280 nm (A) e 365 nm (B). O pico correspondente a luciferina está indicado pelo asterisco.

Finalmente, essa terceira etapa de separação foi encerrada após 8 injeções, onde coletou-se o pico em 17 min. Uma alíquota (20 μ L) dessa

solução final obtida (8 mL) foi re-injetada no HPLC sob as mesmas condições da terceira separação, e os resultados obtidos mostraram um excelente grau de pureza obtido (Figura 39). Um resumo do processo total de purificação no HPLC é mostrado na Figura 40. Assim, a solução final (cerca de 8 mL) foi totalmente seca e em seguida re-dissolvida em 250 μL de D_2O para análise por RMN.

Figura 39: Cromatograma obtido após a injeção de 20 μL no HPLC do pico obtido em 17 min (proveniente da terceira separação), monitorado por absorção no UV em 280 nm (A) e 365 nm (B). O pico correspondente a luciferina está indicado pelo asterisco.

Figura 40. Fluxograma ilustrativo do processo de isolamento e purificação até o extrato final pré-purificado.

A amostra foi levada até o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, da UFSCar. Porém, devido à baixa concentração da amostra não foi possível obter dados de RMN da luciferina. Mesmo utilizando-se uma micro sonda com 200µL de amostra, os sinais de ¹H obtidos foram de intensidade muito baixa e a amostra começou a se degradar durante o processo, causando mudanças no valor de integração.

Entretanto, uma pequena alíquota da solução da luciferina purificada foi separada previamente e injetada no espectrômetro de massa de alta resolução da Central Analítica do IQ-USP. Foi possível obter um valor de massa ($M - 1$) de 298,1837 m/z para luciferina no HRMS (pico do aduto de sódio 312,1735 – massa atômica do sódio 22,9898). Esse resultado obtido é extremamente importante para novas tentativas de determinações estruturais no futuro. Apenas como hipótese, se a molécula de luciferina fosse composta apenas por

átomos de H, C, N e O, sua provável fórmula molecular seria $C_{10}H_{26}N_4O_6$, com massa molecular de 298,1846 m/z, valor muito próximo do obtido (Figura 41).

Figura 41: Espectro de massa de alta resolução da luciferina fúngica purificada.

Além disso, foram injetados 10 μ L da amostra em um HPLC equipado com arranjo de diodos, para que se pudesse obter o espectro de absorção da luciferina purificada, a molécula possui um máximo de absorção em 365 nm (Figura 42). Apesar das tentativas de se obter também o espectro de fluorescência, não houve nenhum sinal com nível de intensidade confiável.

Figura 42: Espectro de absorção da luciferina purificada obtido pela injeção (10 μ L) em um HPLC equipado com arranjo de diodos.

Extrações futuras com quantidade maiores de cogumelos, certamente permitirão que se determine a estrutura da luciferina e suas demais propriedades.

4 Conclusões

Foi possível desenvolver condições para que se pudesse obter emissão de luz enzimaticamente *in vitro*, e confirmar a hipótese enzimática de Airth e Foerster na década de 1960. Os resultados mostraram também que existem ao menos duas enzimas envolvidas no processo de emissão de luz: uma enzima solúvel dependente de NAD(P)H, portanto uma redutase, e uma enzima insolúvel catalisadora do processo de emissão de luz, dessa maneira uma luciferase. Os ensaios cinéticos, inéditos para fungos na literatura, corroboram fortemente essa hipótese enzimática. Ainda, algumas espécies pertencentes das quatro linhagens conhecidas de fungos bioluminescentes (*Armillaria*, *Omphalotus*, *Micenóide* e *Gerronema*) foram testadas e os resultados indicaram que todos os fungos bioluminescentes possuem substâncias relacionadas à emissão de luz e mecanismo de luminescência semelhante. Quando fungos não bioluminescentes, mas ainda filogeneticamente relacionados às espécies bioluminescentes, foram utilizados nenhum sinal de emissão de luz foi obtido. Esse fato demonstra que o ensaio enzimático empregado é extremamente específico para espécies luminescentes.

Esse ensaio enzimático também possibilitou uma maneira prática e precisa de para que se pudesse desenvolver uma metodologia de separação da luciferina. Utilizando-se de extrações quimicamente ativas e seqüências de separações por HPLC foi possível alcançar um grau de pureza final da luciferina bastante satisfatório. Na presença do extrato enzimático e NAD(P)H a luz emitida pela luciferina ($\lambda_{\text{máx}}$ 538 nm) é muito similar ao espectro de bioluminescência do fungo ($\lambda_{\text{máx}}$ 530 nm). A quantidade final da luciferina

purificada não foi suficiente para sua identificação estrutural por RMN, entretanto, outras características da luciferina foram determinadas, como absorção máxima em 365 nm e massa molar de 298,1846 m/z.

5 Parte experimental

A parte experimental foi dividida em cinco itens principais: 5.1 preparação do meio de cultura, 5.2 explorações iniciais, 5.3 estudos mecanísticos: hipótese enzimática e não enzimática, 5.4 estudos cinéticos, e 5.5 purificação da luciferina. Ensaio e preparações que aparecem descritos em dois ou mais itens diferentes, como, por exemplo, EQ, EF, Airth, Dubois, não devem ser tratadas como repetições, esses experimentos foram sendo refinados ao longo de trabalho e em cada etapa apresentaram pequenas modificações em relações as anteriores.

5.1 Preparação de meio de cultura

O meio de cultura utilizado consiste em ágar em uma mistura contendo 10 g de melaço de cana-de-açúcar para fins alimentícios (grau Brix 82,2%, Pol 55,94%), 1,0 g de extrato de levedura (Oxoid) e 20 g de ágar (Oxoid), em 1,0 L de água deionizada. A concentração final dessa mistura foi 1,0% (m/v) de melaço, 0,10% (m/v) de extrato de levedura, 2,0% (m/v) de ágar e pH 6,0, (não tamponado). Para a esterilização dos meios de cultura utilizou-se uma autoclave vertical (Phoenix, modelo AV 250) nas seguintes condições: 30 min, 130°C e 1,2 kgf cm⁻² de pressão. Após o processo de autoclavagem, os meios de cultura foram levados ao fluxo laminar (Trox Technik), onde as placas foram inoculadas com o micélio de culturas do fungo *G. viridilucens*. As culturas do fungo *G. viridilucens* disponíveis no laboratório foram isoladas previamente a partir de corpos de frutificação coletados da região de Mata Atlântica presente no município de Iporanga, SP.⁷⁴ Durante 20 dias, os micélios do fungo *G.*

viridilucens se desenvolveram acondicionados em uma estufa climatizada a 25°C e 90% de umidade. Após esse período, esses fungos servem como matrizes para o cultivo em meio líquido. A composição do meio líquido é similar à descrita acima, entretanto o ágar não foi adicionado à mistura. Os fungos foram raspados das placas com auxílio de um bisturi (aproximadamente 100 mg) e transferidos para um conjunto de erlenmeyers esterilizados de 250 mL com tampa, contendo 50 mL de meio líquido de cultura. Os fungos foram cultivados durante 14 dias à 25°C, sem agitação, antes de serem utilizados. Durante esse tempo, colônias circulares se desenvolvem na superfície do meio líquido, emitindo luz apenas na área em contato com o ar (Figura 7). Após esse período de crescimento, o fungo foi separado do meio de cultura líquida empregando-se uma filtração simples. Dependendo da necessidade de cada experimento, o fungo foi usado fresco ou desidratado. Nesse último caso o micélio obtido foi lavado com água deionizada e então desidratado com auxílio de um liofilizador (Thermo Savant - Micro Modulyo), gentilmente compartilhado pelo Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani. Finalmente, o micélio liofilizado foi triturado sob atmosfera de argônio dentro de uma *glove-box* (mBraun, modelo labmaster 130), gentilmente compartilhada pelo Prof. Dr. Roberto Manuel Torresi, utilizando-se almofariz e pistilo. Porções de 20 mg do micélio triturado foram armazenadas em frascos farmacêuticos lacrados sob argônio e mantidos a -20°C até o uso.

5.2 Explorações iniciais

5.2.1 Separação por cromatografia em camada delgada (CCD)

Aproximadamente 3,0 g do micélio liofilizado de *G. viridilucens*, cultivado como descrito no item anterior, foram transferidos para um *Potter* (Elvehjem), onde se procedeu a extração com metanol (Merck) (10 x 25 mL). Durante todo o processo, o extrato foi sempre mantido sob banho de gelo. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 min a 4°C, utilizando-se uma centrífuga Eppendorf 5402 rotor F-45-18-11 e 5804 R com rotor F34-6-38, modelo SC210A. O sobrenadante foi então separado e o solvente evaporado em um rotaevaporador (Büchi R-205), com banho em temperatura não superior a 30°C, obtendo-se um material levemente amarelado, com massa de 300 mg. O resíduo foi aplicado em cromatoplaças de alumínio (Merk, silicagel 60 F₂₅₄ com fluoresceína), onde se verificou que a mistura de solventes responsável pela melhor separação das substâncias era alcançada com 7/3 n-heptano/acetato de etila (Merck). Duas manchas fluorescentes foram observadas com R_F = 0,50 e 0,70, sendo reveladas respectivamente em 254 e 366 nm em uma câmara de luz UV (Camag). A amostra foi então solubilizada na mistura de n-heptano/acetato de etila e transferida, por meio de uma bomba peristáltica (Gilson, modelo M312), para o aparelho de CCD Radial (Chromatotron 7924T, Harrison Research). Uma parte da amostra, denominada fração Residual Polar (RP), não se dissolveu na mistura de solventes para eluição, sendo separada e armazenada. Foram recolhidos 20 frascos até o término do processo de cromatografia, que foi determinado através de inspeção sob luz UV em 254 e 366 nm. As frações coletadas foram examinadas com CCD analítica sob luz UV, identificando aquelas em que havia

a fração com R_F 0,70 (fluorescente em 366 nm). Estas foram então agrupadas, obtendo-se cerca de 15 mg de material, o qual foi purificado por HPLC (Shimadzu, bombas LC 10AD, detector SPD 10 e controladora CBM 20A), compartilhado gentilmente pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, com coluna C18 5 μ 250 x 4,6 mm (Phenomenex), 3/2 acetonitrila/água, com fluxo de 1,0 mL/min monitoradas em 270 nm (detector UV/vis) e 460 nm com excitação em 300 nm (detector de fluorescência). No caso das duas frações, foram observados os mesmos picos, referentes a três substâncias, em 2,03, 2,17 e 2,46 min. A quantidade de material isolado foi de 0,5 mg, e quanto à substância com R_F = 0,50, não foi possível isolá-la em quantidades consideráveis. A fração RP (cerca de 100 mg) foi aplicada em uma placa de CCD analítica, usando clorofórmio (Merck) puro como eluente. Duas substâncias com R_F = 0 e 0,64 foram reveladas sob luz UV em 366 nm. A mancha fluorescente com R_F = 0,64, muito provavelmente, é a mesma substância que possui R_F = 0,70 eluída em n-heptano/acetato de etila (7/3) já descrita. Desta forma o esforço foi concentrado no isolamento da substância com R_F = 0, com espectro de emissão com banda máxima em 460 nm determinado utilizando um espectrofluorímetro Hitachi F-4500. Foram feitas várias tentativas com a finalidade de encontrar uma mistura de solventes adequada para a eluição. Porém, a substância não foi arrastada, utilizando solventes moderadamente polares, ou caminhou com a linha do solvente, utilizando solventes mais polares, como metanol e metanol/água.

5.2.2 Separação por coluna de troca aniônica fraca (DEAE)

Foi preparado extrato com 3,0 g do micélio cultivado e liofilizado do fungo *G. viridilucens*, em 30% (v/v) metanol/água. Esse extrato teve seu volume reduzido até um 1/8 do original, com auxílio de um rotaevaporador,

ajustou-se seu pH para 6,5 com NaHCO_3 (Merck) diluído e, em seguida, lavou-se com acetato de etila (6 x 15 mL) para remoção de impurezas lipídicas. A fração aquosa teve seu pH ajustado para 2 com HCl (Merck) diluído e extraiu-se novamente com acetato de etila (6 x 15 mL). A fase de acetato de etila foi completamente evaporada, re-dissolvida em 1,5 mL metanol/água 30% (v/v) e adsorvida em uma coluna (2,5 x 5 cm) de troca aniônica fraca (Hi-Trap DEAE FF, Amersham Biosciences). A eluição foi feita usando-se um gradiente de concentração 0 a 1,0 M de NaCl (Sigma-Aldrich), em 30% de metanol, com a bomba peristáltica ajustada para fluxo de 1,0 mL/min. As 12 frações de 5,0 mL coletadas foram injetadas em um HPLC conforme especificações citadas no item anterior.

5.2.3 Separação por extração em fase sólida (SPE)

Preparou-se um extrato com 1,0 g do micélio bruto do fungo *G. viridilucens*, cultivado no laboratório, em 20 mL de uma solução 30% (v/v) metanol/água. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g e o solvente do sobrenadante foi evaporado. A massa resultante de, aproximadamente, 30 mg foi solubilizada em 1,0 mL de água, ajustando-se o pH dessa solução para 2,0 com ácido trifluoracético (TFA) (Merck). Para a extração por SPE foi utilizado uma coluna de troca aniônica forte (SPE MAX Oasis/Waters) de 1,0 mL e empregou-se a seguinte metodologia : i) ativou-se a coluna, pela eluição de 1,0 mL de metanol e 1,0 mL de água deionizada, ii) aplicou-se 1,0 mL da solução da amostra, iii) eluiu-se 1,0 mL de uma solução NH_4OH 2% (Merck) em água (**Fração 1**), iv) 1,0 mL de metanol puro (**Fração 2**) e v) 1,0 mL de TFA 2% em metanol (**Fração 3**). Os solventes das três frações foram removidos com auxílio de um concentrador (Savant Speed Vac Plus, modelo SC210A). Os

resíduos obtidos foram dissolvidos em 1,0 mL de água e depois analisados em um espectrofluorímetro. Dando continuidade à purificação, a **Fração 2** teve seu pH ajustado para 2 com TFA e foi adsorvida em uma coluna SPE de fase reversa (SPE HLB Oasis/Waters) de 3,0 mL. Após o condicionamento da coluna (similar as etapas i a ii descritas para a coluna Oasis MAX), 1,0 mL da **Fração 2** foi adsorvido, e por fim eluiu-se 2,0 mL de cada uma das seguintes misturas de solventes (v/v): a) 5% metanol, 2% de NH_4OH concentrado e 93% água (**Fração 2A**), b) 98% metanol e 2% de NH_4OH concentrado (**Fração 2B**), c) 30% de acetonitrila, 30% de metanol e 2% de NH_4OH concentrado (**Fração 2C**) e d) 90% de metanol, 10% de diclorometano e 2% de NH_4OH concentrado (**Fração 2D**). O mesmo procedimento descrito anteriormente foi efetuado, analisando-se as frações de 2A a 2D com o auxílio de um espectrofluorímetro, sendo a Fração 2B a que apresentou maior fluorescência em 460 nm.

5.2.4 Ensaios de emissão de luz

5.2.4.1 Ensaio de Airth e Foerster

Partiu-se de 1,0 g de micélio fresco, extraído com auxílio de um *potter* em 6,0 mL de tampão fosfato (0,1 M pH 7) contendo 5×10^{-3} M de mercaptoetanol e 1×10^{-3} M de EDTA (todos reagentes da Sigma-Aldrich). O homogenato obtido foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 min a 4°C , e o precipitado descartado. Em seguida o sobrenadante foi centrifugado em uma ultracentrífuga (Hitachi modelo RP50T-2, rotor P50AT2-716) gentilmente compartilhada pela Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira, sob $198.000 \times g$ durante 1 h a 4°C . O precipitado foi separado do sobrenadante e re-suspendido em 8,0 mL do mesmo tampão usado na extração. Sobrenadante e precipitado

foram armazenados sob baixa temperatura até sua utilização. O segundo extrato foi preparado com 0,1 g de micélio fresco, extraído com o mesmo tampão extração, porém a 100°C, durante 60s e resfriado imediatamente a 5°C em gelo. Depois de resfriado, o resíduo foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min a 4°C. Para os ensaios de emissão de luz foram adicionados 2,0 mL do tampão de extração a uma cubeta (3,0 mL) e 200 µL de uma solução 1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich). Em seguida foram acrescentados à mistura reacional 200 µL do sobrenadante proveniente da ultracentrifugação e 200 µL do extrato preparado a 100°C. Por fim, foi adicionado 1,0 mg de NADPH (Sigma-Aldrich). Essa mistura foi mantida sob agitação constante dentro do contador de fótons Hamamatsu, modelo C-767, acoplado a uma fotomultiplicadora Thorn EMI (9658AM) mantida a -12°C por um refrigerador termoelétrico FACT50 (Thorn EMI Electron Tubes Inc) e depois de 90s foram ainda adicionados 9,0 mg de BSA (Sigma-Aldrich). Depois de um período de 110s de incubação o contador de fótons iniciou a leitura e passados 20s de leitura a reação teve início com a adição de 200 µL do precipitado obtido na ultracentrifugação à cubeta. A leitura de emissão de luz da amostra durou 100s e foi realizada em triplicata, a 25°C.

5.2.4.2 Ensaio de Shimomura

Para esse teste de emissão luz preparou-se um extrato com cerca de 1,2 g de micélio fresco utilizando uma solução 30% (v/v) metanol/água. O extrato foi evaporado, obtendo-se aproximadamente 13 mg de material, o qual foi posteriormente re-dissolvido em 1,0 mL de água deionizada. O ensaio foi realizado adicionando-se a uma cubeta de 3,0 mL primeiramente 2,0 mL de tampão acetato 10 mM, pH 5,5 (Sigma-Aldrich), contendo 10 mg de brometo de

cetiltrimetilamônio (Sigma-Aldrich). Em seguida foram adicionados 50 μL de FeSO_4 0,1M (Sigma-Aldrich) e 50 μL do extrato dissolvido em água. Logo após a adição do extrato iniciou-se a leitura de luz. Depois de 20s de leitura acrescentou-se à solução 50 μL de H_2O_2 10% (v/v) (Sigma-Aldrich), para dar início a reação e avaliou-se a quantidade de luz durante 100s. A mistura reacional permaneceu durante todo o experimento sob agitação dentro do contador de fótons. As medidas foram realizadas em triplicata, a 25°C. Foram também realizados testes em caráter preliminar substituindo-se o extrato utilizado pela fração fluorescente com $R_F = 0$ extraída anteriormente.

5.2.4.3 Ensaio quimiluminescente com KOH

Para esse experimento foi preparado um extrato de maneira idêntica ao realizado para o ensaio de Shimomura utilizando 1,0 g de micélio fresco. O material obtido depois da extração foi dissolvido em 1,0 mL de água deionizada. Foram adicionados 100 μL desse extrato a uma cubeta de 3,0 mL contendo 850 μL de DMSO (Merck). Em seguida deu-se início a leitura no contador de fótons. Após 20s de experimento a reação teve início quando se acrescentou 50 μL de uma solução aquosa de 1 M de KOH (Sigma-Aldrich). O experimento foi realizado durante 100s, sob agitação constante e em triplicata, a 25°C. Também foram realizados testes preliminares com a fração fluorescente ($R_F = 0$) no lugar do extrato.

5.2.5 Purificação das frações protéicas

5.2.5.1 Extração

Foi preparado um extrato com 10 g de micélio fresco em 10 mL de tampão Tris 20 mM (pH 7,4, 20 mM KCl, 10 mM NaCl), contendo 2,20 mg fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min a 4°C e em seguida separou-se o sobrenadante do corpo de fundo. O sobrenadante foi aplicado por meio de uma bomba peristáltica em uma coluna ativada de concanavalina A (2,5 x 5 cm) Hi Trap DEAE FF (Amersham Biosciences) com um fluxo de 1,0 mL/min. Procedeu-se a eluição usando o mesmo tampão empregado anteriormente na extração. Foram coletados 5 mL de solução não retida pela coluna, portanto livre de glicoproteínas e demais açúcares. A fração retida na coluna foi eluída com o mesmo tampão, porém contendo 1,5 M de glicose. Durante todo o procedimento sempre que possível o extrato foi mantido sob banho de gelo. Por fim, essas duas frações (protéica e glicoprotéica) foram analisadas em um espectrofluorímetro e comparadas quanto à intensidade de fluorescência em 530 nm (λ_{exc} = 440 nm). Decidiu-se trabalhar com a fração não glicosilada, pois esta apresentou um espectro de fluorescência mais definido do que a glicosilada. Essa fração foi então dialisada contra água durante 24 horas em uma membrana de acetato de celulose para diálise (Sigma-Aldrich), de corte molecular de 10.000 MWCO, sendo por fim liofilizada e depois armazenada a -20°C até sua utilização. A quantidade de proteínas totais foi determinada segundo metodologia de Bradford.⁷⁵

5.2.5.2 SDS – PAGE

As separações por eletroforese em gel (SDS-PAGE) foram realizadas em uma cuba vertical Amersham, modelo miniVE, ligada à uma fonte geradora de tensão EPS 3501 XL. Procedeu-se a separação da fração protéica por SDS-

PAGE segundo a metodologia de Laemli.⁷⁶ Cerca de 20 mg de amostra foram utilizados em cada experimento. Foram aplicados 100V de tensão com uma corrente de 25 mA durante três horas e meia. A revelação das bandas no gel deu-se através do uso de prata segundo Yan.⁷⁷ As bandas coradas no gel foram divididas em 4 grupos, recortadas com auxílio de um bisturi e descoradas (a revelação com prata torna-se reversível omitindo-se o uso de glutaraldeído e formaldeído durante o procedimento) com uma solução 1:1 (v/v) de ferrocianeto de potássio (30 mM) e tiosulfato de sódio (100 mM) (ambos da Synth). Cada uma das quatro placas de gel (já sem a prata) foi homogeneizada em 1mL de tampão em um tubo Eppendorf para extração das proteínas e em seguida centrifugadas sob 5.000 x g durante 10 min e 25°C. Os sobrenadantes de cada um dos 4 tubos foram analisadas no espectrofluorímetro.

5.2.5.3 Filtros moleculares de centrifugação

Com o intuito de se relacionar a variação da intensidade de fluorescência emitida pela fração protéica com sua massa molecular foram utilizados filtros moleculares de centrifugação com tamanho de corte de 10, 30 e 100 kDa (Amicon, Millipore). A fração protéica liofilizada proveniente da coluna de concanavalina A foi dissolvida em 5 mL de água e foram aplicados 400 µL em cada um dos três filtros supracitados. Um quarto tubo sem filtro foi utilizado como controle. As quatro amostras foram centrifugadas a 14.000 x g durante 40 min e a 4°C. Os filtrados foram recolhidos e analisados no espectrofluorímetro. Repetiu-se esse procedimento sob condições desnaturantes, de tal forma que as amostras foram aquecidas a 100°C durante 1 min e resfriadas logo em seguida a 5°C antes de serem filtradas.

5.3 Estudos mecanísticos: hipótese enzimática e não enzimática

5.3.1 Extração em fase sólida (SPE)

Foi preparado um extrato com 1,0 g do micélio fresco do fungo *G. viridilucens*, cultivado em meio líquido no laboratório, em 5 mL de água deionizada. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 10 min a 0°C e em seguida o sobrenadante foi separado e evaporado em um concentrador. Foram obtidos aproximadamente 30 mg de um resíduo de cor castanha. Cerca de 5 mg desse extrato bruto com foi solubilizado em 1,0 mL de água e acidificado com 20 µL de H₃PO₄ (Merck) concentrado. O procedimento de separação por extração em fase sólida foi realizado em uma coluna de troca aniônica fraca (SPE WAX Oasis/Waters) de 1,0 mL. O método consiste em i) ativação da coluna, pela eluição de 1,0 mL de metanol e 1,0 mL de água deionizada, ii) aplicação de 1,0 mL da solução da amostra, iii) passa-se 1,0 mL de uma solução HCOOH 2% (Merck) em água (**Fração 1**), iv) 1,0 mL de metanol puro (**Fração 2**) e v) 1,0 mL de NH₄OH 5% em metanol (**Fração 3**). Os solventes das três frações foram removidos com auxílio de um concentrador e os resíduos re-dissolvidos em 1,0 mL de água. Essas três frações foram analisadas em um espectrofluorímetro quanto à emissão. Todas as frações coletadas apresentam fluorescência em 530 nm ($\lambda_{exc} = 440$ nm) com espectros semelhantes.

5.3.2 Ensaios de emissão de luz

5.3.2.1 Preparação do extrato quente

Para a preparação do extrato quente, 2,0 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5), contendo 1,0 mM de EDTA e 5,0 mM de mercaptoetanol, foi desoxigenado borbulhando-se gás nitrogênio durante 15 min. Foram injetados 1,5 mL desse tampão com auxílio de uma seringa em um frasco Eppendorf vedado com um septo de borracha, contendo 20 mg de micélio liofilizado preparado como descrito anteriormente. O frasco Eppendorf foi aquecido durante 2-3 min a 100°C em um termo-misturador Eppendorf thermomixer, modelo 3557D e rapidamente esfriado em gelo. Em seguida o extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 5 min a 0°C e o sobrenadante foi recolhido em um tubo Eppendorf mantido fechado e em gelo até o momento de seu uso.

5.3.2.2 Preparação do extrato frio

Para a preparação do extrato frio partiu-se de 10 g de micélio fresco do fungo *G. viridilucens* cultivado em meio líquido. A extração foi realizada em um *potter* com 5,0 mL do mesmo tampão usado para o extrato quente, sob banho de gelo. O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 x g durante 10 min a 0°C. O sobrenadante foi separado e armazenado em gelo até seu uso.

5.3.2.3 Componentes necessários para a emissão de luz

Para a determinação de quais são os componentes necessários para que haja emissão de luz enzimaticamente *in vitro* foram utilizadas cinco combinações de experimentos diferentes. Em cada um desses cinco experimentos a substância estudada não é adicionada no meio reacional e em seu lugar usou-se a solução tampão de extração para manter o volume constante (350 µL). Quando adicionados ao tubo de ensaio do luminômetro de

tubo Berthold, modelo Lumat LB 9507, compartilhado gentilmente pela Profa. Dra. Nina Coichev, os volumes usados de cada um dos cinco componentes foram: 100 μL do extrato frio (**EF**), 50 μL do extrato quente (**EQ**), 50 μL de uma solução 1 mg/mL de BSA ou 50 μL de uma solução 0,10% de Tween 20 e 50 μL de NADH 0,8 mM, volume total final 250 μL . As leituras de emissão de luz tiveram início logo após a adição de todos os componentes e duraram 100 segundos. Todas as medidas foram realizadas a 25°C.

5.3.2.4 Emissão de luz utilizando as coenzimas NADH e NADPH

Foram adicionados 100 μL do EF, 50 μL do EF, ambos preparados como já apresentado anteriormente, e 50 μL de BSA (solução 1,0 mg/mL) ao tubo de ensaio do luminômetro. A leitura do aparelho foi iniciada depois da adição de 50 μL de uma solução 1,0 mM de NADH. O mesmo ensaio foi repetido utilizando-se 50 μL de uma solução 1,0 mM de NADPH como coenzima ao invés de NADH. Cada um dos ensaios foi feito em triplicata e a 25°C. O tempo total de cada uma das medidas foi de 200 segundos.

5.3.2.5 Emissão de luz do EF obtidas após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Preparou-se um EF de maneira semelhante à descrita previamente, partindo-se de 10 g de micélio em 10 mL de tampão de extração. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g durante 20 min a 0°C e o sobrenadante foi separado do corpo de fundo. Em seguida foram adicionadas sob agitação ao sobrenadante (volume total de 10 mL) quantidades suficientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Medquim) sólido para que a solução alcançasse 25%, 50% e 75% de

saturação.⁶³ As proteínas precipitadas em cada uma das frações foram re-suspendidas em 1,0 mL de tampão de extração e mantidas em gelo. Foram adicionados em cada ensaio 100 μ L do extrato precipitado (25, 50 ou 75%), 50 μ L de extrato quente e 50 μ L de BSA (solução 1,0 mg/mL). A leitura de emissão de luz teve início após a adição de 50 μ L de uma solução 0,8 mM de NADH e o tempo total de cada ensaio foi de 200 segundos.

5.3.2.6 Emissão de luz das frações do EF obtidas por filtros moleculares de centrifugação

Inicialmente preparou-se um extrato frio com 10 g de micélio em 10 mL de tampão de extração. O homogenato foi então centrifugado a 10.000 x g durante 10 min a 0°C e o sobrenadante foi separado. Retiraram-se três alíquotas de 400 mL do sobrenadante que, em seguida, foram aplicadas em filtros de 35 kDa, 100 kDa e a outra alíquota serviu como controle. As três amostras foram centrifugadas sob 14.000 x g durante 40 min a 0°C. Os filtrados foram recolhidos e aplicados no tubo de amostras do luminômetro. Foram injetados 100 μ L das amostras (35, 100 kDa ou controle), 50 μ L de extrato quente e 50 μ L de BSA (solução 1,0 mg/mL). Iniciou-se o registro de emissão de luz da reação logo em seguida a adição de 50 μ L de uma solução 0,8 mM de NADH. Cada monitoramento durou 200 s, a 25°C.

5.3.2.7 Ensaio de Airth e Foerster

5.3.2.7.1 Preparação do extrato quente

Todo o processo de confecção do extrato quente é similar à descrita anteriormente para o ensaio quente já descrita.

5.3.2.7.2 Preparação do extrato frio

As etapas iniciais de preparação do extrato frio são semelhantes às descritas no ensaio de Dubois, no entanto, o sobrenadante obtido é ultracentrifugado a $194.000 \times g$, durante 60 min a 4°C. As proteínas solúveis encontradas (sobrenadante) são reservadas em gelo e o pellet é re-suspendido em 2mL do tampão de extração contendo 250 mM de sacarose (Sigma-Aldrich).

5.3.2.7.3 Ensaio de emissão de luz

O ensaio padrão desenvolvido é similar ao usado para o teste de Dubois: 200 μ L extrato frio (100 μ L do sobrenadante e 100 μ L do pellet), 50 μ L de uma solução (1mg/mL) de BSA e 50 μ L de extrato quente adicionados ao tubo do luminômetro. Para iniciar a reação são adicionados 50 μ L de uma solução 70 mM de NADPH, concentração final 100 μ M, volume total final de 350 μ L. As reações foram realizadas a 25°C.

5.4 Estudos cinéticos

5.4.1 Preparação do extrato quente/frio

Todo o processo de preparação dos extratos quente e frio é similar à descrita anteriormente para o ensaio de Dubois.

5.4.2 Ensaio de emissão de luz

A influência da concentração do extrato frio na intensidade de emissão de luz foi determinada com 25, 50, 100 e 200 μ L de extrato frio em 50 μ L de

uma solução (1mg/mL) de BSA e 50 μ L de extrato quente adicionados ao tubo do luminômetro. Para iniciar as reações foram adicionados 50 μ L de uma solução 70 mM de NADPH, concentração final 100 μ M, completando-se quando necessário com o tampão de extração para o volume total final 350 μ L. Todas as reações foram feitas a 25°C. O efeito da variação da concentração do extrato quente (2, 5, 10, 25 e 50 μ L) foi realizado fixando-se 50 μ L de uma solução (1mg/mL) de BSA e 200 μ L de extrato frio adicionados ao luminômetro Berthold (modelo Sirius FB15), compartilhado gentilmente pelo Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader. Cada reação foi iniciada pela adição de NADPH e com volume final total da reação de 350 μ L. Para testar o papel do NADPH, uma série de alíquotas de NADPH foram adicionadas para obter-se as concentrações finais de 5, 10, 20, 50 e 100 μ M e iniciar a reação. Para cada teste, 200 μ L de extrato frio, 50 μ L de extrato quente e 50 μ L de uma solução (1mg/mL) de BSA foram usadas. Volume final de 350 μ L.

5.4.3 Efeitos da adição de dodecanal e FMNH₂/FMN

5.4.3.1 Preparação da solução de FMNH₂ e FMN

Uma solução desoxigenada de FMN (ICN Biomedicals) (50 μ M) contendo 1 mM de EDTA como doador de elétrons pode ser rapidamente reduzida fotoquimicamente.⁷⁸ A solução de FMN (1,0 mL) contida dentro de um frasco lacrado com septo foi reduzida através da irradiação de luz UV em 366 nm durante 20 min. Outra solução de FMN de mesma concentração contendo EDTA foi preparada, porém não reduzida, e utilizada como fonte de FMN.

5.4.3.2 Preparação da solução de dodecanal

Uma emulsão dodecanal (ICN Biomedicals) em água (0,1% v/v) foi preparada para este ensaio através de sonicamento durante 1 min utilizando-se um sonificador Transsonic Digital Elma.

5.4.3.3 Ensaio de emissão de luz

A reação foi iniciada de maneira habitual segundo procedimento utilizado no ensaio de Dubois e em torno de 7 min de ensaio, foram adicionados 50 µL da solução escolhida para que se pudesse verificar seu efeito da substância separadamente na intensidade de luz. Repetiu-se o procedimento mais duas vezes para os dois outros compostos.

5.4.3.4 Reações cruzadas entre *G. viridilucens*, *M. lucentipes* e *A. bisporus*

5.4.3.4.1 Preparação do extrato quente/frio

Para os fungos *M. lucentipes* e *P. gardneri* foram utilizados corpos de frutificação ao invés de micélio cultivado como no caso do *G. viridilucens*. Os cogumelos do fungo *M. lucentipes* foram coletado no PETAR (Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira) e congelado até o uso, enquanto que os da espécie *Agaricus bisporus* são vendidos para fins alimentícios e foram adquiridos frescos em um supermercado. Todo o processo de preparação dos extratos quente e frio é similar à descrita anteriormente para o ensaio de Dubois e válido para as três espécies utilizadas, apesar das diferentes procedências.

5.4.3.4.2 Ensaio de emissão de luz

Empregou-se o mesmo ensaio padrão para verificação da emissão de luz, conforme descrito no item ensaio de Dubois, para as três espécies estudadas (*G. viriliucens*, *M. lucentipes* e *A. bisporus*).

Os experimentos de reações cruzadas realizados na San Francisco State University, com espécies americanas e brasileiras foram feitos acordo com a metodologia empregada no Brasil. A única diferença no cultivo e experimentos diz respeito ao luminômetro utilizado, Turner, modelo TD 20/20, cedido pela Profa. Dra. Laura Burrus. Para essa série de experimentos, combinações diferentes foram testadas com 8 espécies de fungos: 5 espécies bioluminescentes (*Armillaria mellea*, *Omphalotus olivascens*, *Mycena fera*, *M. citricolor*, *M. luxperpetua*) e 3 não bioluminescentes para controle (*Filoboletus gracilis*, *M. singeri*,[‡] *M. nivicola*). As espécies bioluminescentes brasileiras empregadas (*G. viridilucens*, *M. luxaeterna* e *P. gardneri*) tornou possível realizar reações cruzadas com todas as 4 linhagens conhecidas de fungos bioluminescentes: *Armillaria*, *Omphalotus*, *Micenóide* e *Gerronema*.

5.5 Isolamento e purificação da luciferina fúngica

5.5.1 Separação por cromatografia de troca aniônica

5.5.1.1 Preparação do extrato quente/frio

Foram utilizados 100 mg de micélio liofilizado dissolvido em 4 mL de tampão de extração para a preparação do extrato quente. Todo o processo de

[‡]Apesar de *M. singeri* ser uma espécie descrita como bioluminescente, a cultura desse fungo disponível no laboratório (proveniente da Costa Rica) não apresentou luminescência alguma. Sabe-se que algumas espécies de fungos bioluminescentes podem emitir luz mais fraca ou até mesmo não emitir luz quando cultivadas em laboratório. A composição do meio de cultura utilizado poderia também estar relacionada a esse efeito.

preparo dos extratos quente e frio é similar à descrita anteriormente para o ensaio de Dubois.

5.5.1.2 Cromatografia de troca aniônica

Cerca de 3,5 mL de extrato quente foram injetados em uma coluna de troca aniônica fraca HiTrapp DEAE FF 5 mL (GE Healthcare) de 5 mL com auxílio de uma seringa. A amostra foi purificada usando como eluente tampão fosfato (10 mM, pH 7,5) contendo 5 mM de mercaptoetanol, bombeado para a coluna com auxílio de uma bomba peristáltica. O tampão foi saturado com nitrogênio durante 1 hora antes de ser aplicado. Após aplicação de 4 volumes de eluente (20 mL) mL, foi iniciado um gradiente de NaCl de 0 a 1M com mais 4 volumes. Desta maneira, foram coletadas 20 frações de 2 mL cada. O teor de proteína nas frações foi determinado em um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2010 em 280 nm. Para se determinar a atividade das frações recolhidas, 50 µL de cada uma delas foi testada como fonte de substrato (extrato quente) no ensaio de Dubois.

5.5.2 Extração acelerada por solvente

5.5.2.1 Preparação do extrato quente por ASE

Foram utilizados 10 g de corpos de frutificação do fungo *P. gardneri*, coletados na cidade de Gilbués no Piauí. Os cogumelos secos foram triturados em liquidificador (Tosco equipamentos). O material seco foi misturado com 15 g sílica [(sílica gel, 70-230 mesh, 60 Å (Sigma)] e colocados no compartimento do extrator Dionex, modelo ASE 300. Os fungos foram extraídos durante 15 min com cerca de 90 mL de água deionizada saturada com nitrogênio a 80°C e sob

1500 psi de pressão. O extrato obtido foi então filtrado utilizando filtros de centrifugação de 15 mL Amicon (Millipore) com corte molecular de 10 kDa. O extrato foi filtrado a $5.000 \times g$ durante 1 hora a 4°C e o homogenato resultante foi liofilizado até total desidratação.

5.5.2.2 Preparação do extrato frio

O extrato frio foi preparado através da metodologia já descrita para o ensaio de Dubois. O ensaio de emissão foi feito empregando como fonte de extrato quente o homogenato obtido através do procedimento descrito no item anterior, proveniente do extrator ASE. Os demais componentes do teste foram usados de maneira usual.

5.5.3 Estudo da influência do solvente durante a extração por ASE

5.5.3.1 Preparação do extrato quente por ASE

Foram utilizados 10 g de corpos de frutificação do fungo bioluminescente *P. gardneri* coletados na cidade de Gilbués no Piauí. Os cogumelos secos foram triturados com auxílio de um liquidificador até a formação de um pó fino e em seguida foram adicionados cerca de 10g de Celite®. Essa mistura foi colocada no reservatório de extração do aparelho ASE. Foram estudadas as eficiências de diferentes solventes: i) H₂O MilliQ, ii) tampão fosfato 10 mM, pH 3,2 iii) H₂O/HCOOH (0,025%) pH 3,0, e iv) H₂O/HCOOH (0,025%) pH 3,0 contendo 20 mM de mercaptoetanol. Para cada extração foi utilizado uma nova mistura de cogumelos triturados com Celite®. Cada mistura foi extraída a 80°C e sob 1500-1700 psi de pressão, utilizando um tempo de pré-aquecimento de 5 min e extração de 15 min. Todo o processo foi realizado sob atmosfera de nitrogênio ultrapuro e o volume médio final de extrato obtido foi de

aproximadamente 110 mL. No final do processo cada extrato é armazenado pelo extrator em frascos com septo (previamente preenchidos com argônio). Esses frascos foram mantidos lacrados e sob banho gelo até seu uso.

5.5.3.2 Preparação do extrato frio

O extrato frio foi preparado através da metodologia já descrita para o ensaio de Dubois. O ensaio de emissão foi feito empregando como fonte de extrato quente o homogenato obtido através do procedimento descrito no item anterior, proveniente do extrator ASE. Os demais componentes do teste foram usados de maneira usual.

5.5.4 Extração quimicamente ativa

Cerca de 10,0 g de corpos de frutificação do fungo *P. gardneri* foram triturados e misturados à Celite® conforme descrito no item anterior. A mistura cogumelo/Celite® foi extraída utilizando o extrator ASE com programação similar ao item anterior e empregando-se como solvente H₂O/HCOOH (0,025%) pH 3,0 contendo 20 mM de mercaptoetanol.

Esse procedimento de extração e separação foi repetido ainda mais quatro vezes perfazendo um total de 150mg do resíduo amarelo oleoso que foi dissolvido em 10,0 mL de tampão de extração (tampão fosfato 10 mM, pH 7,0), contendo 20 mM de mercaptoetanol) e guardado em um frasco com septo sob nitrogênio a -20°C.

5.5.5 Extração acelerada com solvente

Foram utilizados 300 g corpos de frutificação desidratados (equivalentes a 3 kg de fungos frescos) do cogumelo bioluminescente *P. gardneri*, coletados

na cidade de Gilbués no Piauí. Os cogumelos secos foram triturados com auxílio de um liquidificador até a formação de um pó fino e em seguida foram adicionados a este cerca de 150g de Celite® [70-230 mesh, 60 Å (Sigma)]. Foram realizadas 30 extrações com 30 porções de 15 g dessa mistura. Em cada cartucho de extração foram adicionados além dos 15 g da mistura mais 5 g de Celite® pura para completar o preenchimento total do compartimento. O solvente utilizado para a extração era composto por uma solução H₂O/HCOOH (0,025%) pH 3,0 contendo 20 mM de mercaptoetanol. Cada mistura foi extraída a 80°C e sob 1500-1700 psi de pressão, utilizando um tempo de pré-aquecimento de 5 min e extração de 15 min. Todo o processo foi realizado sob atmosfera de nitrogênio ultrapuro e no final do processo cada extrato foi armazenado pelo extrator em frascos com septo. Esses frascos foram mantidos lacrados e sob banho gelo até seu uso. O volume médio final de extrato obtido para cada uma das 30 extrações foi de aproximadamente 110 mL totalizando cerca de 3,0 L de extrato bruto.

5.5.6 Extração quimicamente ativa

Os 3,0 L de extrato bruto obtido através do extrator ASE foram divididos em 6 porções de 0,5 L com a finalidade de facilitar o manuseio do extrato durante o processo de extração quimicamente ativa. Cada uma das porções de 0,5 L teve seu pH ajustado para 3,0 com HCl concentrado. Em seguida, cada uma dessas porções foi extraída 3 vezes com 150 mL de acetato de etila em um funil de separação, e todas as fases orgânicas obtidas foram combinadas, enquanto que as fases aquosas foram descartadas.

A fase orgânica total obtida, cerca de 2,5 L, teve seu volume reduzido em um rotaevaporador até aproximadamente 100 mL. Esse volume foi extraído 3 vezes com 40 mL de uma solução aquosa contendo 5% de NaHCO_3 , pH 8,0. Nessa etapa a fase orgânica foi descartada e a fase aquosa obtida (aproximadamente 110 mL) teve seu pH ajustado para 3,0, com HCl concentrado. Por fim, essa fase aquosa foi por extraída 3 vezes com 40 mL de acetato de etila e a fase orgânica final obtida foi totalmente seca em um rotaevaporador. A fase aquosa foi descartada.

O produto final que foi obtido, cerca de 800 mg, apresentou-se na forma de um resíduo oleoso marrom avermelhado. Esse resíduo foi dissolvido em cerca de 10 mL de uma solução aquosa contendo HCOOH (0,025%) pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol. Essa solução foi guardada em um frasco com septo sob atmosfera de argônio a -20°C até seu posterior uso.

5.5.7 Primeira etapa de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foram injetados 20 μL do resíduo obtido em um HPLC da marca Waters, (equipado com duas bombas 551, arranjo de diodos 996 e detector de fluorescência 470) com coluna de fase reversa C18, $100 \times 4,6$ mm monolítica, Onyx (Phenomenex) e utilizando como fase móvel de proporção variável: solvente A, $\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (0,025%) pH 3,0 contendo 2 mM de mercaptoetanol e solvente B, acetonitrila contendo HCOOH (0,025%) e 2 mM de mercaptoetanol. Adotou-se um gradiente em etapas, inicialmente a concentração de acetonitrila utilizada na fase móvel foi de 3%, depois de 10 min de eluição a concentração é acetonitrila é alterada para 15% e por fim, aos 20 min a concentração de acetonitrila é aumentada para 50%. A amostra foi eluída durante 30 min com

fluxo de 2,0 mL/min. A separação foi monitorada em 254 nm por um detector de arranjo de diodos e por fluorescência em λ_{exc} 345 nm e λ_{em} 500 nm. Foram coletadas 3 frações: i) 0 a 10 min, ii) 10 a 20 e iii) 20 a 30 min para testes de atividade. Cada uma dessas três frações foi extraída com acetato de etila (3x de 6,5 mL). As frações aquosas foram descartadas. As três frações orgânicas obtidas foram totalmente evaporadas um rotaevaporador a 25°C e cada respectivo resíduo (em todos os casos os resíduos apresentaram cor levemente amarela) foram dissolvidos em 500 μ L de tampão extração (fosfato, 0,1 M, pH 7,5), contendo 1,0 mM de EDTA e 5,0 mM de mercaptoetanol. Em seguida foram feitos testes para se determinar a atividade quanto à emissão de luz.

Apenas a fração ii (correspondente ao intervalo de 10 a 20 min) se mostrou ativa frente ao ensaio padrão. Dessa maneira, durante nova separação cromatográfica, três frações foram coletadas no intervalo de: a) 10 a 13, b) 13 a 16 e c) 16 a 20 min. Procedeu-se com a extração de cada fração de maneira semelhante à extração anterior. Cada amostra coletada foi extraída com acetato de etila (3x com 1,5 mL) e em seguida a fase orgânica foi totalmente evaporada. Finalmente, cada resíduo obtido foi dissolvidas em 500 μ L de tampão extração, e testado com o ensaio padrão. As frações b e c apresentaram atividade de emissão de luz. Como muito provavelmente o pico estivesse dividido entre as regiões correspondentes das frações b e c (em torno de 16 min), essa região foi então investigada. Dessa maneira, o extrato final foi injetado três vezes e a região de 15 a 17 min foi recolhida. As três frações foram reunidas e extraídas com acetato de etila conforme já descrito. A fase orgânica foi totalmente seca e re-dissolvida em 200 μ L de uma solução aquosa

contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol. Essa fração foi chamada de luciferina parcialmente purificada, e foi re-injetada no HPLC. Em paralelo, devido às semelhanças do espectro absorção entre o pico com atividade (16 min) e as coenzimas NADPH e NADH, foram feitas duas injeções no HPLC, visando comparar o tempo de retenção dos padrões das coenzimas. Foi feita uma eluição de 20 µL de uma solução padrão de NADPH (0,5mg/mL) e outra de 20 µL de uma solução padrão de NADH (0,5mg/mL). As condições utilizadas no HPLC foram exatamente as mesmas usadas na separação do pico em 16 min.

Finalmente, deu-se prosseguimento a separação da substância em 16 min. Todas as condições anteriores e aparelhos foram mantidos, apenas foi alterada a proporção entre os solventes A e B. A melhor separação foi conseguida utilizando 90/10 solventes A/B, no modo isocrático. O pico com tempo de retenção em torno de 10 min é o responsável pela emissão de luz, nenhum outro pico no cromatograma foi ativo frente ao teste padrão. Dessa maneira, a substância contida nesse pico contém provavelmente a luciferina fúngica. Todas as condições de extração e ensaio empregados foram idênticas as já mencionadas anteriormente. Essa condição de separação foi repetida cerca de 40 vezes e o volume coletado foi totalmente seco em um rotaevaporador. O material resultante, de cor levemente amarela, foi dissolvido em 1,5 mL de uma solução aquosa contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol.

5.5.7.1 Espectro de emissão de luz

O espectro da emissão de luz foi medido utilizando um espectrofluorímetro Hitachi 4500 ajustado no modo de luminescência. A

velocidade de varredura empregada foi de 2400 nm/min, abertura da fenda em 2 nm e tensão de 900 V. O ensaio de emissão de luz foi composto por 600 µL de extrato frio feito a partir do fungo *M. luxaeterna* (conforme descrito no item 5.3.2.2), 150 µL de uma solução 1mg/mL de BSA e 20 µL da solução contendo pico em 10 min, obtido na 1ª etapa de separação no HPLC (item 5.5.7) . A reação foi iniciada pela adição de 150 µL de uma solução 2,0 mM de NADH (concentração final 0,25 mM), volume final reacional 1200 µL.

5.5.8 Segunda etapa de separação por HPLC

A melhor condição de separação da solução contendo a luciferina, proveniente da primeira separação, foi alcançada utilizando um gradiente com as fases móveis H₂O/HCOOH (0,025%) pH 3,0, e acetonitrila contendo HCOOH (0,025%). O gradiente utilizado foi composto por acetonitrila variando de 10% até 40%, no intervalo de 0 a 15 min, e de 40% até 80%, no intervalo de 15 min a 20 min. As amostras injetadas (50 µL) foram eluídas durante 20 min em uma coluna C18 5µ 250 x 4,6 mm (Phenomenex) com fluxo de 1,0 mL/min, em um HPLC Shimadzu (sistema descrito no item 5.2.1). O sistema de detecção do HPLC não dispunha de arranjo de diodos nem detector de fluorescência, porém permitia a detecção por dois comprimentos de onda distintos no UV/VIS, assim foram utilizados 280 nm e 320 nm. Todos os picos visualizados foram coletados e a atividade de todos eles foi testada individualmente, utilizando-se o ensaio padrão. Dada a maior concentração da luciferina disponível, não houve a necessidade de se realizar a extração diversas vezes com acetato de etila e concentração de cada pico, diferentemente do que ocorreu na primeira separação. Cada pico foi recolhido e diluído 10 vezes em uma solução aquosa de HCOOH (0,025%) pH 3,0. O

ensaio padrão foi utilizado para testar a atividade dessas amostras, conforme já descrito. Apenas o pico em 13 min demonstrou ser ativo. Dessa maneira, toda solução obtida da primeira separação foi aplicada no HPLC e o pico em 13 min foi recolhido. Todo o volume que foi coletado durante essa segunda separação foi seco em um rotaevaporador e o resíduo re-dissolvido em 1,0 mL de uma solução aquosa contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2 mM de mercaptoetanol.

5.5.9 Terceira etapa de separação por HPLC

Para a 3ª e última etapa de purificação da luciferina foram utilizados uma mistura metanol/água, contendo 0,025% de HCOOH, na proporção 4/6 em modo isocrático. As amostras injetadas (100 µL) foram eluídas durante 20 min com fluxo de 1,0 mL/min, utilizando-se a mesma coluna e HPLC descritos na 2ª etapa de separação, com detecção no UV/VIS em 280 nm e 365 nm. Entre todos os picos testados a luciferina foi encontrada em torno de 17 min. Foram feitas 8 injeções e a luciferina foi recolhida. O volume coletado foi seco, e a luciferina obtida foi dissolvida em 250 µL de D₂O e mantida em frasco lacrado com argônio a -20°C para posterior RMN.

5.5.10 Espectroscopia de massa de alta resolução (HRMS) e espectro de absorção

Foram injetados 10 µL da solução contendo a luciferina purificada, por injeção direta, em um espectrômetro de massas (LC-MS MicroTOF, Bruker Daltonics), da Central Analítica do IQ-USP. A detecção do espectrômetro foi ajustada no modo negativo, com temperatura de 180°C e tensão no capilar de

4kV. O espectro de absorção foi realizado por um arranjo de diodos em um LC-MS Bruker Daltonics, modelo Esquire 3000 Plus.

5.5.11 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A solução contendo luciferina dissolvida em D₂O (200 µL) foi levada lacrada sob argônio e mantida em gelo seco para o laboratório do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, DQ – UfSCar, São Carlos. A luciferina foi acondicionada em uma micro sonda (Bruker) para RMN, de 2,5 mm, sob argônio. Para os experimentos de ressonância foi utilizado um equipamento da marca Bruker, modelo DRX, 400 MHz, 9,4 Tesla.

6 Referências

1. Harvey, E. N. *A History of Luminescence from Ancient Times to 1900*; J. H. Furst Company: Baltimore, 1957.
2. Shimomura, O. *Bioluminescence – Chemical Principles and Methods*; World Scientific Publishing Co. Pte. Lt. Singapore, 2006.
3. Campbell, A. K. *Chemiluminescence – Principles and Applications in Biology and Medicine*; VCH, Chichester, 1988.
4. Harvey, E. N. *Living Light*, Princeton University Press, New Jersey, 1940.
5. Dubois, R. C. *R. Soc. Biol.* **1887**, 39, 564.
6. Harvey, E. N. *The Nature of Animal Light*; L. B. Lippincott, Philadelphia, 1920.
7. Johnson, F. H.; Sugiyama, N.; Shimomura, O.; Saiga Y.; Haneda, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1961**, 47, 486.
8. Shimomura, O. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1985**, 39, 351.
9. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223.
10. Wilson, T.; Hastings, J. W. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, 14, 197.
11. Dubois, R. C. *R. Seances Soc. Biol. Paris.* **1885**, 2, 559.
12. Læssøe, T. *Mushrooms*; Dorling Kindersley, New York, 2000.
13. Desjardin, D. E.; Capelari, M.; Stevani, C. V. *Mycologia.* **2007**, 99, 317.
14. Desjardin, D. E.; Braga-Neto, R. *Edinburgh J. Bot.* **2007**, 64, 275.
15. Wassink, W. C. Luminescence in Fungi. In: *Bioluminescence in Action*, 1978, New York, USA.
16. Desjardin, D. E.; Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 170.
17. Shimomura, O. *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 355.
18. Shimomura, O. *J. Exp. Botany.* **1992**, 43, 1519.
19. Sivinski, J. M.; *Psyche.* **1981**, 88, 383.
20. Jess, S.; Bingham, J. F. W. *J. Agric. Sci.* **2004**, 142, 421.
21. Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8, 1416.
22. Horner, H. T.; Tiffany, L. H.; Knaphus, G. *Mycologia.* **1995**, 87, 44.

23. Mamiya, Y. *Jpn. J. Nematol.* **2006**, 36, 1.
24. Lingle, W. L. *Mycol. Soc. Am. Newslett.* **1989**, 40, 36.
25. Lingle, W. L. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1993**, 8, 100.
26. Bermudes, D.; Petersen, H.; Nealson, K. H. *Mycologia.* **1992**, 84, 799.
27. Airth, R. L.; McElroy, W. D. *J. Bacteriol.* **1959**, 77, 249.
28. Airth, R. L.; Foerster, G. E. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1960**, 56, 173.
29. Airth, R. L. Characteristics of Cell-Free Fungal Bioluminescence. In: *Light and Life*, 1961, Baltimore, USA.
30. Airth, R. L.; Foerster, G. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 97, 567.
31. Airth, R. L.; Foerster, G. E. *Am. J. Bot.* **1965**, 52, 495.
32. Airth, R.L.; Foerster, G. E.; Behrens, P. Q. The Luminous Fungi. In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
33. Kuwabara, S.; Wassink, E. C. Purification and Properties of the Active Substance of Fungal Luminescence, In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
34. Endo, M.; Kajiwara, M.; Nakanishi K. *Chem. Commun.* **1970**, 309.
35. Isobe, M.; Uyaku D.; Goto, T. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1987**, 1, 181.
36. Isobe, M.; Uyaku D.; Goto, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 44, 1169.
37. Nakamura, H.; Kishi, Y.; Shimomura, O. *Tetrahedron.* **1988**, 44, 1597.
38. Shimomura, O.; Satoh, S.; Kishi, Y. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1993**, 8, 201.
39. Hidalgo, F. J.; Zamora, R. *J. Biol. Chem.* **1993**, 22, 16190.
40. Teranishi, K.; Goto, T. *Chem. Lett.* **1989**, 1423.
41. Cummings, R. D.; Doering, T. L. *Essentials in Glycobiology*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, 2008.
42. Wiedenmann, J.; Elke, C.; Spindler, K. D.; Funke, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, 97, 14091.
43. McElroy, W. D.; Hastings, J. W.; Sonnelfeld, V.; Coulombre, J. *Science.* **1953**, 118, 385.
44. McElroy, W. D.; Hastings, J. W.; Sonnelfeld, V.; Coulombre J. *J. Bacteriol.* **1954**, 67, 402.
45. Rudie, N. G.; Ohtsuka, H.; Wampler, J. E. *Photochem. Photobiol.* **1976**, 23, 74.

46. Dunlap, J. C.; Hastings, J. W. *Biochemistry*. **1981**, *20*, 983.
47. McElroy, W. D.; Chase, A. M. *J. Cellular Comp. Physiol.* **1951**, *38*, 401.
48. Johnson, F. H.; Stachel, H. D.; Shimomura, O.; Haneda, Y. Partial purification of the luminescence system of a deep-sea shrimp *Hoplophorus gracilorostris*. In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
49. Shimomura, O.; Johnson, F. H. Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescent system. In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
50. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Haneda, Y. Isolation of the luciferin of the New Zealand fresh-water limpet, *Latia neritoides* gray. In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
51. Shimomura, O. *Photochem. Photobiol.* **1986**, *44*, 671.
52. Harvey, E.N. *Science*. **1916**, *44*, 208.
53. Johnson, F. H.; Stachel, H. D.; Taylor, E. C. Chemiluminescence and fluorescence Cypridina luciferin and of some new indole compounds in dimethylsulfoxide. In *Bioluminescence in Progress*, 1996, Princeton, USA.
54. Dunlap, C. J.; Hastings, J. W. *Biochemistry*. **1981**, *20*, 983.
55. Hastings, J. W.; Gibson, Q. H.; Friedland, J.; Spudich, J. Molecular mechanisms in bacterial bioluminescence: on energy storage intermediates and the role of aldehyde in the reaction. In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
56. Hastings, J. W.; Riley, W. H.; Massa, J. J. *Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1473.
57. Altman, S. M.; Crook, E. M. *Nature*. **1953**, *171*, 76.
58. Ball, E. G.; Cooper, D. J. *Biol. Chem.* **1949**, *180*, 113.
59. Keilin, D.; Hartree, E. F. *Biochem. J.* **1949**, *44*, 205.
60. Bonner, W. D. *Nature*. **1950**, *165*, 757.
61. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*, Worth Publishers, 2000, USA.
62. Watanabe, H.; Hastings, J. W. *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *44*, 181.

63. Abelson, J. N.; Murray, P. D.; Melvin, S. I. *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*, Academic Press, 1990.
64. Tu, S. C.; Mager, H. I. X. *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 657.
65. Makemson, J. C.; Hastings, J.W. *J. Biolum. Chemilum.* **1991**, 6, 131.
66. Heimann, K.; Matuszewski, J.; Stiffey, A. V.; Klerks, P. L. *J. Phycol.* **2000**, 36, 29.
67. Hastings, J. W.; Vergim, M.; DeSa, R. Scintillons: the Biochemistry of Dinoflagellate Bioluminescence. In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
68. *Dionex Application Note 322: selective extraction of PCBs from fish tissue using accelerated solvent extraction (ASE)*, Dionex corporation, Sunnyvale, 2004.
69. Harvey, E. N. *J. Gen. Physiol.* **1919**, 1, 269.
70. Cormier, M. J.; Hori, K.; Kreiss, P. Studies on the Bioluminescence System of the Sea Pansy, *Renilla reniformis*. . In: *Bioluminescence in Progress*, 1966, Princeton, USA.
71. Icke, R. N.; Wisegarver, B. B.; Alles, G. A. *Org. Synth.* **1945**, 25, 89.
72. Bitler, B.; McElroy, W. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, 72, 358.
73. Hori, K.; Cormier, M. J. *Biochim. Biophys Acta.* 1965, 102, 386.
74. Desjardin, D. E.; Capelari, M.; Stevani, C.V. *Fungal Diversity.* **2005**, 18, 9.
75. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
76. Laemmli, U. K. *Nature.* **1970**, 227, 680.
77. Yan, J. X.; Wait, R.; Berkelman, T.; Harry, R. A.; Westbrook, J. A.; Wheeler, C. H.; Dunn, M. J. *Electrophoresis.* **2000**, 21, 3666.
78. Deluca, M. *Bioluminescence and Chemiluminescence, Methods in Enzymology*, Academic Press, 1978.

Súmula Curricular

Anderson Garbuglio de Oliveira

Data de nascimento: 02/03/1982

Formação

2005-presente	<i>Doutorando, Química Orgânica</i>	Universidade de São Paulo, USP Instituto de Química, São Paulo, Brasil
2001-2004	<i>Bacharel, Química</i>	Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Florianópolis, Brasil

Histórico profissional

2009-2009 (fevereiro-maio)	San Francisco State University, Califórnia, EUA <i>Estágio</i> (supervisor: Dr. Dennis E. Desjardin)
2005-presente	Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil <i>Doutorando, Química Orgânica</i> (orientador: Dr. Cassius V. Stevani) <i>Estudo da bioluminescência do fungo <i>Gerronema viridilucens</i></i>
2003-2004	Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil <i>Bacharel, Química</i> (supervisor: Dr. Almir Spinelli) <i>Resistência à corrosão de uma liga de $NiTi$ utilizada em próteses cardiovasculares</i> (Trabalho de conclusão de curso)
2003-2004	Nano Endoluminal SA, Florianópolis, Brasil <i>Iniciação científica</i> (supervisor: Dr. Almir Spinelli) <i>Resistência à corrosão de uma liga de $NiTi$ utilizada em próteses cardiovasculares</i>

Experiência em ensino

2005-2006	Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil <i>Monitor das disciplinas, QFL 3301 – reatividade de compostos orgânicos e QFL 3302 – técnicas experimentais em química orgânica</i>
-----------	---

Bolsas

2005-presente	Bolsa de doutorado direto, Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo, FAPESP. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. orientador: Dr. Cassius V. Stevani <i>Estudo da bioluminescência do fungo <i>Gerronema viridilucens</i></i>
2003-2004	Bolsa de iniciação científica, Fundação de amparo à pesquisa e extensão universitária, FAPEU, empresa Nano Endoluminal SA. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

supervisor: Dr. Almir Spinelli

Resistência à corrosão de uma liga de NiTi utilizada em próteses cardiovasculares

Publicações

Artigos

1. “The enzymatic nature of fungal bioluminescence” Anderson G. Oliveira, Cassius V. Stevani, *Photochem. Photobiol. Sci.*, (Capa), **2009**, 8, 1416-1421.
2. “Fungi bioluminescence revisited” Dennis E. Desjardin, Anderson G. Oliveira, Cassius V. Stevani, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7, 170-182.
3. “Microstructure and surface composition effects on the transpassivation of NiTi wires for implant purposes” Anderson G. Oliveira, Fernando C. Giacomelli, C. Giacomelli, A. Spinelli, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, 16, 131-138.
4. “Effect of electrolytic ZrO coatings on the breakdown potential of NiTi wires used as endovascular implants” Fernando C. Giacomelli, C. Giacomelli, Anderson G. Oliveira, A. Spinelli, *Mater. Lett.*, **2005**, 59, 754-758.

Conferências & simpósios selecionados

1. “Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos” apresentação oral In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2009**, Fortaleza, Brasil.
2. “Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos” *Palestrante convidado* In: I Regional Forum on Biotechnology, **2008**, Sorocaba, Brasil.
3. “Brazilian species of bioluminescent fungi” Anderson G. Oliveira, Luiz F. Mendes, Cassius V. Stevani, In: XIV International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, **2006**, San Diego, USA, Luminescence Chichester: John Wiley & Sons, 21, p. 292.
4. “Microstructure is the main factor determining the transpassivation of NiTi wires” Fernando C. Giacomelli, Anderson G. Oliveira, C. Giacomelli, A. Spinelli, In: III Latin-American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, **2004**, Campinas, Brasil, p. BR188.
5. “Comparison of the corrosion resistance of Ni-Ti and Co-Cr-Mo biomaterials in simulated biological fluids” Anderson G. Oliveira, Fernando C. Giacomelli, C. Giacomelli, A. Spinelli, In: XI SBQ Sul, **2003**, Pelotas, Brasil, p. FQ-01.
6. “Electrochemical behavior and dissolution analysis of a Co-Cr-Mo dental implant using SEM and EDS” Fernando C. Giacomelli, Anderson G. Oliveira, C. Giacomelli, A. Spinelli, In: XI SBQ Sul, **2003**, Pelotas, Brasil, p. FQ-03.

Textos em revistas/jornais

1. “Luzes vivas” Anderson G. Oliveira, Luiz F. Mendes, Olívia Domingues, Cassius V. Stevani,

Revista Pesquisa FAPESP, (Capa), **2010**, 168, 16-19.

2. “Luz que vem da terra” R. Ribeiro, Anderson G. Oliveira, Luiz F. Mendes, Cassius V. Stevani, *National Geographic Brasil*, **2006**, 79, 34-36.

Outros

1. “Resistência à corrosão de uma liga de NiTi utilizada em próteses cardiovasculares” Anderson G. Oliveira, **2004**, trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.