UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

OLIVIA DOMINGUES BAZITO

Estresse oxidativo e bioluminescência nos fungos

Gerronema viridilucens e Mycena lucentipes

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

13/04/2012

OLIVIA DOMINGUES BAZITO

Estresse oxidativo e bioluminescência nos fungos

Gerronema viridilucens e Mycena lucentipes

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

Orientador: Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani

Co-orientador: Prof. Dr. Etelvino José H. Bechara

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Estresse oxidativo e bioluminescência nos fungos
Gerronema viridilucens e *Mycena lucentipes*”**

OLIVIA DOMINGUES BAZITO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Química.

Aprovada por:

Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani
Orientador e Presidente

Profa. Dra. Lilian Rothschild
IQ-USP

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto Lardner
IQ-USP

Prof. Dr. Ernani Pinto Junior
FCF - USP

Prof. Dr. Moacir Aluisio Torres
UDESC

SÃO PAULO
23 de maio de 2012

Dedicatória

*Aos meus pais e ao Reinaldo,
pelo apoio sempre, e à pequena
Helena, que mudou o sentido da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de doutorado direto concedida e pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cassius V. Stevani, pela orientação e dedicação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara, pelas sugestões e críticas que enriqueceram o projeto.

Ao Instituto de Química da USP, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao meu colega Luiz Fernando Mendes, por me ensinar a preparar culturas e pelo seu trabalho que trouxe informações importantes para a realização deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório do Prof. Etelvino Bechara, Adriano, Camila, Chrislaine e Rita pelos momentos de convivência agradável, pela ajuda nos experimentos e por compartilhar os momentos de estresse e conquistas. E também à Doris, que manteve o laboratório em ordem para nós.

Aos meus colegas do GPQVA.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo, Renato e Leonardo pela colaboração na parte experimental.

Ao Prof. Dr. Erick L. Bastos pelas análises estatísticas.

Ao Reinaldo, que sempre me deu total apoio na carreira e soube dizer as palavras certas nos momentos de desânimo e de alegria.

Aos meus pais, pela educação que me deram, o que proporcionou todas as minhas conquistas.

Epígrafe

*“Fé inabalável é somente aquela que
pode encarar a razão, face a face,
em todas as épocas da humanidade”.*

Allan Kardec

RESUMO

Bazito, O.D. **Estresse oxidativo e bioluminescência nos fungos *Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes***. 2012. 111 p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas normalmente durante o metabolismo de organismos aeróbios. Fungos degradadores de lignina geram estas espécies também no processo de degradação da lignina. As espécies de fungos bioluminescentes *Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes* foram utilizadas para se estabelecer possível dependência entre intensidade de bioluminescência, viabilidade celular e atividades das enzimas de defesa antioxidante e ligninolíticas nos micélios e corpos de frutificação. Verificou-se o efeito de espécies causadoras de estresse químico (metais e fenóis) na emissão de luz, viabilidade celular, defesas antioxidantes e enzimas de respiração celular no fungo bioluminescente *G. viridilucens*, com o objetivo de conectar a inibição da bioluminescência com danos oxidativos ao organismo. Constatou-se que diferentes espécies de fungos bioluminescentes podem apresentar características diferentes quanto à emissão de luz e proteção antioxidante. Diferenças na intensidade e variação temporal da emissão de luz de diferentes espécies foram observadas nos corpos de frutificação e também no micélio. Isto foi revelado pela irregularidade do perfil de luz reprodutível para a espécie *M. lucentipes*, ao contrário do observado para *G. viridilucens*. A viabilidade celular de ambas as espécies varia com o tempo, sendo que no caso de *G. viridilucens* seu perfil é similar ao da bioluminescência. Os ensaios enzimáticos indicam maior atividade no micélio dos fungos do que nos corpos de frutificação,

provavelmente pela função específica reprodutora do corpo de frutificação, enquanto a atividade metabólica do fungo está concentrada no micélio. As enzimas ligninolíticas também apresentam atividade baixa nas culturas estudadas, provavelmente por serem enzimas de degradação extracelulares. O fato de ambas viabilidade celular e bioluminescência do micélio serem reduzidas na presença dos metais (cobre e cádmio) e fenóis (fenol e 2,4,6-triclorofenol) testados atesta a inter-relação entre atividade luminogênica e injúria oxidativa aos fungos. Os metais parecem afetar mais negativamente as defesas antioxidantes dos fungos do que os fenóis, os quais possivelmente são eliminados pela atividade da glutathione S-transferase (GST), sem também afetar as demais defesas antioxidantes. No conjunto, estes resultados possibilitam estabelecer uma relação metabólica entre abatimento da bioluminescência e as defesas antioxidantes do organismo. No caso dos metais, os sistemas de defesa antioxidante envolvendo a glutathione são bastante importantes, tanto para eliminar peróxidos produzidos na presença de cobre, como na quelação de cádmio pela glutathione. Sob condições normais, a bioluminescência, defesas antioxidantes e respiração celular do organismo estariam funcionando e o NAD(P)H seria mobilizado por todos estes sistemas. Quando o fungo é submetido ao estresse químico, o fluxo de NAD(P)H seria desviado da bioluminescência para sustentar prioritariamente as defesas antioxidantes e a respiração celular, essenciais para a proteção, manutenção e reprodução do organismo.

Palavras-chave: bioluminescência de fungos, estresse oxidativo, defesas antioxidantes, glutathione, toxicidade de metais, toxicidade de fenóis.

ABSTRACT

Bazito, O.D. **Oxidative stress and bioluminescence in the fungi *Gerronema viridilucens* and *Mycena lucentipes***. 2012. 110 p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Reactive Oxygen Species (ROS) are normally produced during the metabolism of aerobic organisms. Ligninolytic fungi also produce these oxidizing species also during the lignin degradation process. The bioluminescent species *Gerronema viridilucens* and *Mycena lucentipes* were studied aiming to establish a correlation between the temporal profiles of bioluminescence, cellular viability and antioxidant defense enzymes and ligninolytic enzymes in mycelium and fruiting bodies. Chemical toxicants such as metals and phenols were here found to affect light emission, cellular viability, antioxidant defenses and cellular respiration enzymes when administered to *G. viridilucens*, thereby attesting a metabolic connection between bioluminescence inhibition and fungal oxidative damage. Different species of fungi exhibit different characteristics linked to light emission and antioxidant defenses. Differences in light emission displayed by different species do not resume to fruiting bodies, but the light profile and intensity can also vary in the mycelia. This may explain the irreproducibility of the light profile from *M. lucentipes*, differently to that observed with *G. viridilucens*. The cellular viability of both species varies with time, *G. viridilucens* profile being similar to the time course of bioluminescence. The enzymatic data pointed to higher activities in mycelium than in fruiting bodies, probably due to a main reproductive function of the latter, whereas the metabolic activities are prevalent in the mycelium. Ligninolytic enzymes exhibit low activities in the extracts of fungus samples, probably because they are extracellular degradation enzymes. The inhibition effect of phenols and metals (copper and cadmium) on

mycelium viability reinforces the notion that cellular oxidative damage hampers bioluminescence emission. Redox active (copper) and heavy metals (cadmium) were found to display higher impact on antioxidant defenses than phenols (phenol and 2,4,6-trichlorophenol), which are expected to be promptly metabolized and excluded by principally glutathione S-transferase (GST). Notably, a metabolic correlation between bioluminescence inhibition and antioxidant defenses was unveiled by the present work. Regarding the metals, glutathione was found to be a crucial antioxidant, both to eliminate peroxides when in the presence of copper, and to act as a cadmium chelating agent. Under normal conditions, the bioluminescence system, the antioxidant defenses and the cellular respiration sets cooperate through the common demand of reducing power of NAD(P)H. Under chemical stress, the NAD(P)H flux would be deviated from bioluminescence, to principally sustain the antioxidant defenses and cellular respiration, essential for the protection, maintenance and reproduction of the organism.

Keywords: fungi bioluminescence, oxidative stress, antioxidant defenses, glutathione, metal toxicity, phenol toxicity.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 -	Algumas vias de formação de EROs e defesas oxidantes	21
Esquema 2 -	Mecanismo de reação da dismutação do radical ânion superóxido pela SOD	24
Esquema 3 -	Decomposição do H_2O_2 pela CAT	24
Esquema 4 -	Redução de proteínas pela GSH e agregação proteica	25
Esquema 5 -	Mecanismo de eliminação de peróxidos pela GPx	26
Esquema 6 -	Redução da GSSG pela GR	26
Esquema 7 -	Eliminação de xenobióticos pela GST	26
Esquema 8 -	Mecanismo de atuação da MnP em fungos	28
Esquema 9 -	Oxidação da lignina mediada por álcool veratrílico	29
Esquema 10 -	Diagrama simplificado do processo de degradação de lignina por fungos	30
Esquema 11 -	Mecanismo enzimático de emissão de luz por fungos	32
Esquema 12 -	Reação monitorada na determinação da atividade de CAT	49
Esquema 13 -	Reação monitorada na determinação da atividade de SOD	50
Esquema 14 -	Reação monitorada na determinação da atividade de GPx	51
Esquema 15 -	Reação monitorada na determinação da atividade de GR	52
Esquema 16 -	Reação monitorada na determinação da atividade de GST	52
Esquema 17 -	Reação monitorada na determinação da atividade de MnP	53
Esquema 18 -	Reação monitorada na determinação da atividade de LP	53
Esquema 19 -	Reação monitorada na determinação da atividade de LAC	54
Esquema 20 -	Reação monitorada na determinação da atividade de CS	55
Esquema 21 -	Reação monitorada na determinação da atividade de COX	56
Esquema 22 -	Reação monitorada na determinação da atividade de G6PD	56
Esquema 23 -	Reação utilizada no teste de viabilidade celular	58
Esquema 24 -	Derivatização da GSH com NEM	58
Esquema 25 -	Via das pentoses fosfato	88
Esquema 26 -	Conversão de NADH em NADPH catalisada pela NAD(P) ⁺ transidrogenase	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da glutathiona na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) .	25
Figura 2 - Partes dos corpos de frutificação, píleo e estipe	31
Figura 3 - A - Luciferina de pirilampos e B - Coelenterazina (luciferina de espécies marinhas)	32
Figura 4 - Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial	40
Figura 5 - Corpos de frutificação dos fungos <i>Gerronema viridilucens</i> no claro (A) e escuro (B) e <i>Mycena lucentipes</i> no claro (C) e escuro (D), coletados no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, SP	43
Figura 6 - Esquema de cultivo dos fungos: (A) esterilização do fura-rolhas e pinça metálica, (B) perfuração do meio de cultura na placa de 100 mm, (C) transferência do inóculo para as placas de 35 mm com auxílio de uma pinça metálica e (D) placa de 35 mm inoculada	44
Figura 7 - Suportes para medição da bioluminescência em placas de 35 mm	45
Figura 8 - Dependência da intensidade de bioluminescência (BL) no micélio cultivado de <i>G. viridilucens</i> em função do tempo de inoculação (n = 6)	62
Figura 9 - Perfil da bioluminescência no fungo <i>M. lucentipes</i> em culturas monitoradas do 1 ^o ao 21 ^o dia de cultivo (n = 9)	62
Figura 10 - Perfil temporal de viabilidade celular do fungo bioluminescente <i>G. viridilucens</i> em cultura (n = 9)	64
Figura 11 - Perfil temporal de viabilidade celular do fungo bioluminescente <i>M. lucentipes</i> em cultura (n = 9)	65
Figura 12 - Atividade enzimática de CAT no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	69
Figura 13 - Atividade enzimática de SOD no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	70
Figura 14 - Atividade enzimática CAT (A) e SOD (B) no micélio do fungo <i>M. lucentipes</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	70
Figura 15 - Atividade enzimática de GPx no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	71
Figura 16 - Atividade enzimática de GR (A) e níveis de GSH (B) no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	72

Figura 17 - Níveis de GSSG (A) e atividade enzimática de GST (B) no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	73
Figura 18 - Atividade enzimática de LAC no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	74
Figura 19 - Atividade enzimática de MnP no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	75
Figura 20 - Atividade enzimática de LP no micélio do fungo <i>G. viridilucens</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	75
Figura 21 - Atividade enzimática de GPx (A) e níveis de GSH (B) no micélio do fungo <i>M. lucentipes</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	76
Figura 22 - Atividade enzimática de GR (A) e níveis de GSSG (B) no micélio do fungo <i>M. lucentipes</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	77
Figura 23 - Atividade enzimática de GST (A), LAC (B) e LP (C) no micélio do fungo <i>M. lucentipes</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	78
Figura 24 - Atividade enzimática de MnP no micélio do fungo <i>M. lucentipes</i> com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9)	79
Figura 25 - Viabilidade celular de <i>G. viridilucens</i> após exposição de 24 h a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	80
Figura 26 - Atividade enzimática de CAT (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	82
Figura 27 - Atividade enzimática de SOD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	83
Figura 28 - Atividade enzimática de GPx (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	84
Figura 29 - Atividade enzimática de GR (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	84
Figura 30 - Atividade enzimática de GST (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	85

Figura 31 - Níveis de glutathiona (cinza): GSH (A) e GSSG (B) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	86
Figura 32 - Atividade enzimática (cinza) de CS (A) e COX (B) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	90
Figura 33 - Atividade enzimática de G6PD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9)	92
Figura 34 - Viabilidade celular em <i>G. viridilucens</i> após exposição de 24 h a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n = 9)	93
Figura 35 - Atividade enzimática de CAT e SOD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n=9)	95
Figura 36 - Atividade enzimática (cinza) de GPx (A) e GR (B) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n=9)	96
Figura 37 - Atividade enzimática de GST (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n=9)	97
Figura 38 - Níveis de glutathiona (cinza): GSH (A) e GSSG (B) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n=9)	98
Figura 39 - Atividade enzimática (cinza) de CS (A) e COX (B) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n=9)	100
Figura 40 - Atividade enzimática de G6PD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de <i>G. viridilucens</i> , após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n=9)	101
Figura 41 - A: Consumo (amarelo e verde) e produção (azul) de NADH e NADPH no fungo <i>G. viridilucens</i> em condições normais. B: Consumo (amarelo) e produção (azul) de NADH e NADPH em fungo sob estresse químico	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo das principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos	23
Tabela 2 -	Planejamento fatorial com 28 experimentos para estudar os efeitos da temperatura, pH, melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura, na emissão de luz e crescimento do fungo <i>M. lucentipes</i> em placa de Petri de 35 mm	60
Tabela 3 -	Parâmetros enzimáticos antioxidantes e ligninolíticos e níveis de glutathione dos corpos de frutificação congelados dos fungos bioluminescentes <i>G. viridilucens</i> e <i>M. lucentipes</i>	67
Tabela 4 -	Parâmetros enzimáticos antioxidantes e ligninolíticos e níveis de glutathione em micélio dos fungos bioluminescentes <i>G. viridilucens</i> e <i>M. lucentipes</i> em culturas de 8 a 20 dias	68
Tabela 5 -	Parâmetros enzimáticos antioxidantes e do metabolismo e níveis de glutathione em micélio de <i>G. viridilucens</i> tratado com Cd^{2+} (3,0 mM) e Cu^{2+} (8,1 mM)	81
Tabela 6 -	Parâmetros enzimáticos antioxidantes e do metabolismo e níveis de glutathione em micélio de <i>G. viridilucens</i> tratado com fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM)	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
AV	álcool veratrílico
BL	bioluminescência
CAT	catalase
COX	citocromo c oxidase
CS	citrato sintase
DMB	1,4-dimetoxibenzeno
ERO	espécie reativa de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FMN	flavina mononucleotídeo (forma oxidada)
FMNH ₂	flavina mononucleotídeo (forma reduzida)
G6PD	glicose 6-fosfato desidrogenase
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione (forma reduzida)
GSSG	glutathione (forma oxidada)
GST	glutathione S-transferase
LAC	lacase
LP	lignina peroxidase
MnP	manganês peroxidase
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
PETAR	Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE E GLUTATIONA	24
1.2. ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO LIGNINOLÍTICA	27
1.3. BIOLUMINESCÊNCIA EM FUNGOS	31
1.4. ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR METAIS	33
1.4.1. Toxicidade de metais em fungos	37
1.5. ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR FENÓIS	38
1.6. ENZIMAS DO METABOLISMO AERÓBIO	39
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. COLETA DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO	43
3.2. CULTIVO DO MICÉLIO	44
3.3. MEDIÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA	45
3.4. REAGENTES	45
3.5. MATERIAIS	46
3.6. ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR METAIS E FENÓIS	47
3.7. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	48
3.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	49
3.8.1. Determinação de Catalase (CAT)	49
3.8.2. Determinação de Superóxido Dismutase (SOD)	49
3.8.3. Determinação de Glutathione Peroxidase (GPx)	50
3.8.4. Determinação de Glutathione Redutase (GR)	51
3.8.5. Determinação de Glutathione S-transferase (GST)	52
3.8.6. Determinação de Manganês Peroxidase (MnP)	52
3.8.9. Determinação de Lignina Peroxidase (LP)	53
3.8.10. Determinação de Lacase (LAC)	54
3.8.11. Determinação de Citrato Sintase (CS)	54
3.8.12. Determinação de Citocromo c oxidase (COX)	55

3.8.13. Determinação de Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)	56
3.9. PERFIL DA BIOLUMINESCÊNCIA	56
3.10. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	57
3.11. DETERMINAÇÃO DE GSH E GSSG	58
3.12. CONDIÇÕES DE CULTURA PARA <i>Mycena lucentipes</i>	59
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 61
4.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA PARA <i>M. lucentipes</i>	61
4.2. PERFIL DA BIOLUMINESCÊNCIA	61
4.3. VIABILIDADE CELULAR	63
4.4. ENSAIOS ENZIMÁTICOS	65
4.5. ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR METAIS	80
4.6. ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR FENÓIS	92
 5. CONCLUSÕES	 102
 6. REFERÊNCIAS	 105

1 INTRODUÇÃO

O oxigênio apareceu na atmosfera terrestre com a evolução de organismos fotossintetizantes. A produção crescente deste gás trouxe como vantagem a formação da camada de ozônio, que conferiu aos organismos proteção contra os letais raios UV-C. Por outro lado, muitos seres inicialmente anaeróbios morreram, devido à nova atmosfera oxidante. Os que conseguiram sobreviver adaptaram-se, desenvolvendo defesas antioxidantes ou passando a viver em locais com menor concentração de oxigênio. Hoje, o oxigênio representa 21% da composição atmosférica. Nos organismos aeróbios ele é necessário para a produção de energia pela cadeia transportadora de elétrons, sendo cerca de 90% dele utilizado pelas mitocôndrias (Halliwell e Gutteridge, 2007). De forma simplificada, a rota metabólica para produção de energia envolve, essencialmente, a oxidação dos alimentos, que cedem elétrons para as espécies NAD^+ , FMN e FAD, gerando, respectivamente, NADH, FMNH_2 e FADH_2 , as quais, por sua vez, são reoxidadas pelo oxigênio nas mitocôndrias, por uma cadeia de citocromos e outros carreadores de elétrons, produzindo H_2O e ATP (Nelson e Cox, 2000). O complexo da citocromo oxidase é que promove a redução do oxigênio molecular por quatro elétrons a água. O oxigênio, porém, também sofre redução parcial em etapas unieletrônicas a peróxidos e radicais de oxigênio, entre eles o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$), altamente oxidante e, desse modo, pode-se comportar como um gás tóxico quando modifica enzimas e outras biomoléculas. Os organismos só sobrevivem graças às defesas antioxidantes químicas e enzimáticas, endógenas e adquiridas na dieta (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) formam-se, portanto, naturalmente em organismos aeróbios durante a redução do oxigênio a água para a produção de ATP, na cadeia respiratória, e de peróxidos e oxirradicais, em reações catalisadas por monooxigenases e dioxigenases. Além da respiração mitocondrial, enzimas como NADPH oxidases, xantina oxidase e óxido nítrico sintases também geram EROs (Winterbourn, 2008). Apesar de o termo EROs ser amplamente usado, ele não se refere a uma entidade única, mas a um conjunto de substâncias, como superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, peroxinitrito, ácido hipocloroso, oxigênio singlete e radical hidroxila, com reatividade, localização celular, cinética e difusão específicas (Murphy *et al.*, 2011). O mesmo se aplica aos antioxidantes, compostos que previnem, eliminam ou reparam a formação de EROs, que são específicos para cada espécie reativa e, muitas vezes, ao eliminar uma espécie geram outra também deletéria (Winterbourn, 2008).

Seres vivos aeróbios, tais como fungos degradadores de lignina (ligninolíticos), tiveram que desenvolver mecanismos de proteção para evitar a ação deletéria dessas espécies em condições de desequilíbrio metabólico. Além das EROs, geradas pela respiração celular, a degradação de lignina gera grandes quantidades de H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e outras espécies radiculares altamente reativas (Guillen *et al.*, 2000) (Hammel *et al.*, 2002) tornando-se vital a intervenção preventiva, interceptadora ou corretora de danos oxidativos por uma família de enzimas [ex., superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR)] e substâncias antioxidantes de baixa massa molecular, tais como glutathione reduzida (GSH), ascorbato, citrato, carotenóides, vitamina E e urato (Halliwell e Gutteridge, 2007) (Esquema 1). Apesar de as mitocôndrias serem a

maior fonte de EROs, estas também podem ser geradas por radiação UV e no metabolismo de drogas e xenobióticos (Winterbourn, 2008).

Esquema 1. Algumas vias de formação de EROs e defesas antioxidantes.

O $O_2^{\bullet -}$ forma-se pela redução monoeletrônica do oxigênio na cadeia respiratória principalmente pela ubiquinona (Turrens, 1997). Surge uma condição denominada estresse oxidativo quando o fluxo produzido de superóxido e de outras EROs é ainda maior, provocando alterações em biomoléculas se não for eficientemente dismutado a H_2O_2 pela SOD (Halliwell e Gutteridge, 2007). Embora a SOD catalise a quebra do $O_2^{\bullet -}$, gerando H_2O_2 , grandes quantidades de $O_2^{\bullet -}$ não representam necessariamente aumento na concentração de H_2O_2 produzido, uma vez que o $O_2^{\bullet -}$ pode reagir com NO formando peroxinitrito (Winterbourn, 2008). Já a produção de $HO^{\bullet}$ intracelular, que é a EROs mais reativa e potencialmente nociva, acontece a partir da redução do H_2O_2 por $O_2^{\bullet -}$, na presença de Fe^{3+} (Reação de

Haber-Weiss) ou na presença de Fe^{2+} (Reação de Fenton). A alta reatividade do $\text{HO}^{\bullet}$ confere a esta espécie baixo tempo de meia-vida, 10^{-9} s, atacando rapidamente o alvo mais próximo do local onde o radical foi produzido (Dickinson e Chang, 2011). Íons de cobre também são reativos na produção de EROs, como Cu^+ reagindo com H_2O_2 para formar $\text{HO}^{\bullet}$ (Halliwell e Gutteridge, 2007). O efeito deletério do H_2O_2 se deve principalmente a produtos secundários como os radicais hidroxila formados pela reação de Fenton (Winterbourn, 2008). Entretanto, embora o H_2O_2 tenha um alto potencial de redução sendo, portanto, um forte agente oxidante, a maioria das reações tem alta energia de ativação, sendo que os tióis estão entre as poucas biomoléculas que reagem diretamente com ele (Winterbourn e Hampton, 2008). O efeito provocado por EROs também depende do local onde foi gerada e da proximidade da biomolécula alvo, e ainda, da sua capacidade de difusão e de permear membranas (Dickinson e Chang, 2011). O superóxido tende a atacar alvos próximos a onde foi gerado, já H_2O_2 tem a capacidade de permear membranas (Winterbourn, 2008).

Halliwell e Gutteridge definem como antioxidante “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato”. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática (SOD, CAT, GPx, etc.) e não-enzimática (GSH, polióis e outras moléculas pequenas), como já mencionado (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, através de diferentes mecanismos, as EROs são destruídas de forma a impedir reações posteriores de propagação em cadeia.

Embora as EROs estejam fortemente associadas a danos celulares, doenças e envelhecimento, estudos recentes têm demonstrado outras funções das EROs nos organismos, como importantes mediadoras em processos biológicos, como

sinalização e regulação (Winterbourn, 2008; Dickinson e Chang, 2011; Murphy *et al.*, 2011). As EROs também têm papéis de proteção, pois são agentes citotóxicos da fagocitose, da fecundação e esclerotização de ovos e de vias de transdução de sinais (Azzi, 2007). Assim, um “excesso” de antioxidantes poderia comprometer tais eventos vitais às células e aos organismos. A Tabela 1 apresenta as principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos.

Tabela 1. Resumo das principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos.

SISTEMA	FUNÇÃO
Não Enzimáticos	
α -tocoferol	inibidor de lipoperoxidação
β -caroteno	supressor de $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete)
licopeno	supressor de $^1\text{O}_2$
ubiquinol 10	sequestrador de radicais
ácido ascórbico	várias funções antioxidantes
ácido úrico	sequestrador de radicais
glutathiona	várias funções antioxidantes
Enzimáticos	
superóxido dismutases	dismutação do $\text{O}_2^{\cdot -}$
catalases	decomposição de H_2O_2 em O_2 e H_2O
glutathiona peroxidases	redução de peróxidos
peroxirredoxinas	redução de peróxidos
tiorredoxinas	redução de dissulfetos
Enzimáticos auxiliares	
glutathiona redutases	regeneração de GSH (a partir de GSSG/NADPH)
transidrogenases	produção de NADPH (a partir de NADH)
glicose-6-fosfato desidrogenase	produção de NADPH

1.1 ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE E GLUTATIONA

A SOD, encontrada nas formas CuZnSOD (citossol), MnSOD (mitocôndria) e FeSOD (matriz celular de algumas bactérias, plantas e algas) (Halliwell e Gutteridge, 2007), catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . O mecanismo de reação da CuZnSOD, apresentado no Esquema 2, envolve a redução do cobre no sítio ativo da enzima e a formação de uma molécula de O_2 . A enzima reduzida reage com outro radical $O_2^{\cdot-}$ formando H_2O_2 . O Zn^{2+} tem um papel prioritariamente estrutural, estabilizando as conformações ativas da enzima (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Esquema 2. Mecanismo de reação da dismutação do radical ânion superóxido pela SOD.

O H_2O_2 , produzido por diversos processos metabólicos e enzimas, é decomposto pela CAT (Esquema 3) e peroxidases (Esquema 4). A CAT atua diretamente na decomposição do H_2O_2 , convertendo-o a H_2O e O_2 .

Esquema 3. Decomposição do H_2O_2 pela CAT.

As peroxidases utilizam o H_2O_2 para oxidar outros substratos. Entre estes substratos está a GSH, nome cunhado para o tripeptídeo γ -glutamilcisteinilglicina

(Figura 1). A GSH, em sua forma reduzida, é um dos principais agentes antioxidantes em organismos aeróbios. Sua forma oxidada (GSSG) consiste de dois resíduos de GSH unidos por uma ponte dissulfeto. A GSH, presente nas células em concentração milimolar, protege o grupo tiol das proteínas contra a oxidação e consequente desativação, através da doação de átomo de hidrogênio, formando radical tiila ($GS^{\bullet}$), o qual recombina-se para formar GSSG (Esquema 4) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Figura 1. Estrutura da glutathiona na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

Esquema 4. Redução de proteínas pela GSH e agregação proteica.

A GPx e outras peroxirredoxinas removem H_2O_2 , e peróxidos orgânicos (ex., cumeno-hidroperóxido e *t*-butil-hidroperóxido), reduzindo-os a H_2O ou ROH, com a concomitante oxidação de GSH a GSSG. A doação de hidrogênio é feita exclusivamente pela GSH, no caso de GPx, e outros tióis, no caso de peroxirredoxinas. A GPx possui quatro subunidades proteicas, cada uma contendo um átomo de selênio no sítio ativo. Durante a catálise, a forma seleneto da proteína (proteína- Se^-) reage com o peróxido, formando um ácido selênico (proteína-SeOH).

O peróxido, por sua vez é reduzido a água ou a um álcool, dependendo da natureza do peróxido (Esquema 5) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Esquema 5. Mecanismo de eliminação de peróxidos pela GPx.

A relação GSH/GSSG em células normais é alta, o que pressupõe um mecanismo para reduzir GSSG de volta a GSH. A enzima responsável por essa redução é a GR que utiliza NADPH na redução da GSSG (Esquema 6) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Esquema 6. Redução de GSSG pela GR.

A GSH também participa do metabolismo de xenobióticos. Muitos destes são metabolizados após a conjugação de formas quinônicas do xenobiótico com a GSH, através da adição de Michael, catalisada pela enzima glutathione S-transferase (GST) (Esquema 7) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Esquema 7. Eliminação de xenobióticos pela GST.

A GST é uma enzima importante no estudo de estresse químico dos organismos, principalmente causado por compostos organoclorados e organofosforados, pois esta enzima é responsável pela solubilização e eliminação

destes e outros compostos orgânicos do organismo de seres eucariontes (Fujioka e Casida, 2007).

1.2 ENZIMAS DE DEGRADAÇÃO LIGNINOLÍTICA

Fungos de podridão branca secretam enzimas extracelulares envolvidas na oxidação de compostos aromáticos complexos, como a lignina. Estas enzimas, capazes de realizar o ataque ligninolítico, são duas peroxidases não específicas: - a manganês peroxidase (MnP) e a lignina peroxidase (LP), que usam H_2O_2 como co-substrato - e a lacase (LAC), que utiliza oxigênio molecular, portanto uma oxigenase (Field *et al.*, 1992). A principal função destas enzimas é produzir oxirradicais capazes de atacar uma grande variedade de moléculas orgânicas. Os fungos de podridão branca produzem várias combinações de LP, MnP e LAC (Gadd, 2001).

A lignina está presente na parede celular de plantas e tem a função de protegê-las. A parede celular possui uma camada interna de celulose, seguida de hemicelulose e lignina (mais externa). Esta última representa 25-30% da biomassa e é bastante resistente à degradação microbiana sob condições naturais (Arora *et al.*, 2002). A lignina, que confere rigidez à parede celular, é um polímero aromático tridimensional, não simétrico e com ligações diversas, composto por três unidades monoméricas: álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. Fungos atacam a lignocelulose para obter carbono e nitrogênio necessários para sua sobrevivência. Acredita-se que a degradação ligninolítica acontece para que o fungo tenha acesso à celulose, pois a lignina tem baixo valor calórico para fungos e não poderia ser sua única fonte de carbono. Por possuir uma estrutura complexa seria pouco provável

que uma única enzima fosse capaz de degradá-la (Gadd, 2001), daí a vantagem evolutiva dos fungos em produzir as três enzimas ligninolíticas citadas.

A MnP é uma enzima extracelular, que possui um grupo prostético heme, essencial na degradação da lignina. Ela é secretada por uma variedade de fungos que usam H_2O_2 para oxidar Mn^{2+} (co-substrato) a um complexo de Mn^{3+} , que por sua vez oxida grupos fenólicos da lignina. Como qualquer peroxidase, a oxidação do Mn^{2+} envolve a formação do Composto I, com ferro de alta valência formal (Esquema 8) (Gadd, 2001). Na degradação da lignina, os fungos utilizam o Mn^{2+} presente nela e produzem H_2O_2 endogenamente, necessário para a atividade ligninolítica (Palma *et al.*, 1997). Contudo, o excesso de H_2O_2 pode destruir o sítio catalítico da MnP levando à formação da enzima na forma inativa (Composto III).

Esquema 8. Mecanismo de atuação da MnP em fungos.

A LP, também uma hemoproteína, já foi considerada uma enzima chave na degradação da lignina por sua capacidade de oxidar compostos de alto potencial de redução (Papinutti e Martinez, 2006). Entretanto, a LP é produzida pela maioria, mas não por todas as espécies de fungos ligninolíticos. A produção de peroxidases em fungos, como a LP, pode ser estimulada pelo estresse causado pela baixa concentração de nitrogênio. A LP oxida grupos metoxila e anéis aromáticos não fenólicos através da geração inicial de cátion-radicais. Seu pH ótimo é abaixo de 3,0, mas a enzima demonstra sinais de instabilidade quando mantida em meios muito ácidos. A LP é uma enzima solúvel em água, glicosilada, secretada por fungos de

podridão branca e, como a MnP, é dependente de H_2O_2 . Ela é, entretanto, a única capaz de produzir cátion-radicais da oxidação monoeletrônica de compostos aromáticos não-fenólicos como álcool veratrílico (AV) ou 1,4-dimetóxiбенzeno (DMB), que têm potenciais redox fora do alcance da MnP e LAC. O álcool veratrílico é excretado juntamente com a LP e aumenta sua atividade, provavelmente para protegê-la da inativação por H_2O_2 (Gadd, 2001). Cátion-radicais de AV e DMB agem como mediadores redox não específicos.

O mecanismo catalítico da LP é similar ao da MnP. A oxidação unieletrônica inicial na presença de H_2O_2 , leva à formação do Composto I e um cátion-radical porfirínico. Dois passos de redução, envolvendo um elétron cada, restauram o sítio catalítico da enzima. O Composto II pode reagir com H_2O_2 para dar o Composto III inativo, dependendo da concentração relativa de H_2O_2 (Gadd, 2001). Na oxidação de lignina ou hidrocarbonetos poliaromáticos mediada por álcool veratrílico, o radical $AV^{\bullet+}$ é gerado como produto primário da oxidação de H_2O_2 , catalisado pela LP (Esquema 9).

Esquema 9. Oxidação de lignina mediada por álcool veratrílico.

A LAC deve ser a principal enzima no processo de degradação de lignina, pois fungos mutantes, deficientes nesta enzima, perdem completamente a atividade ligninolítica (Rabinovich *et al.*, 2004). Além disso, ela é essencial naqueles fungos que não possuem atividade peroxidásica (sem LP e MnP) (Papinutti e Martinez, 2006). A LAC é uma enzima extracelular glicosilada, capaz de catalisar a oxidação

monoeletrônica de uma grande variedade de compostos diidróxi e diamino aromáticos. Ela está envolvida na degradação ligninolítica através da oxidação de grupos fenólicos livres na lignina e geração de radicais fenoxila. Na presença de O_2 converte-os em radicais semiquinona e, então, daí a quinona (Gadd, 2001). A LAC possui cobre como cofator, diferentemente da LP e da MnP que possuem o grupo heme. Todas as lacases contêm quatro ou mais átomos de cobre e têm a propriedade de reduzir O_2 completamente a H_2O , portanto são oxidases. Há diversas outras oxidases extracelulares, tais como glicose oxidase (Kelley e Reddy, 1986), glioxal oxidase (Kersten, 1990), aril-álcool oxidase (Muheim *et al.*, 1990) e celobiose oxidase (Ander, 1994), que produzem H_2O_2 necessário ao processo de degradação da lignina por LP e MnP (Esquema 10).

Esquema 10. Diagrama simplificado do processo de degradação de lignina por fungos.

1.3 BIOLUMINESCÊNCIA DE FUNGOS

Fungos basidiomicetos são organismos eucariontes formados por hifas, e um conjunto de hifas forma o micélio. Estes fungos produzem basidiomas (corpos de frutificação) que são formados pelo píleo e pelo estipe (Figura 2). Assim como insetos e animais marinhos, algumas espécies de fungo são capazes de emitir luz. O local da emissão, no entanto, varia entre as espécies. Algumas emitem luz apenas no píleo, outras apenas no estipe, há ainda espécies que não emitem luz no corpo de frutificação, apenas no micélio.

Figura 2. Partes dos corpos de frutificação, píleo e estipe.

Para culturas em laboratório, o efeito do meio de cultura na emissão de luz é importante em possíveis aplicações de fungos bioluminescentes como sensores em bioensaios de toxicidade ambiental (Weitz *et al.*, 2001). Temperatura e pH são importantes fatores que influenciam a intensidade de bioluminescência (BL) das culturas. Para que se possa usar fungos em bioensaios de toxicidade, faz-se necessário maximizar a emissão de luz. A otimização das condições de cultura para o fungo *Gerronema viridilucens* já foi descrita (Mendes *et al.*, 2008).

O mecanismo de emissão de luz por fungos é um processo enzimático dependente de NAD(P)H. Foi sugerido na década de 60 (Airth e Foerster, 1962) e recentemente confirmado por Oliveira (Oliveira e Stevani, 2009) (Esquema 11). A molécula responsável pela emissão de luz é genericamente chamada de luciferina e a reação responsável pela emissão de luz é catalisada pela luciferase. As estruturas das luciferinas de pirilampos e alguns organismos marinhos (Barros e Bechara, 1998) (Rees *et al.*, 1998) são mostradas na Figura 3, para estes organismos foi demonstrado possível papel como antioxidante da luciferina e luciferase, assim como para a bactéria *Xenorhabdus luminescens* (Colepicolo *et al.*, 1992). Para os fungos, a estrutura da luciferina ainda não foi elucidada.

L: precursor da luciferina, LH₂: luciferina, LO: luciferina oxidada

Esquema 11. Mecanismo enzimático de emissão de luz por fungos.

Figura 3. A - Luciferina de pirilampos e B - Coelenterazina (luciferina de espécies marinhas).

Resumidamente, a luciferina é produzida a partir da redução de seu precursor por NAD(P)H, catalisada por uma redutase. A luciferina formada é, então, oxidada por oxigênio molecular, reação catalisada pela luciferase com liberação de energia na forma de luz fria e visível.

Há um único trabalho na literatura que correlaciona a emissão de luz com a atividade enzimática em fungos bioluminescentes (Shimomura, 1992). Este discute o papel da SOD e CAT na intensidade de luz emitida, utilizando os fungos *Armillaria mellea*, *Mycena citricolor*, *Mycena lux-coeli*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus* e *Pleurotus japonicus*. Shimomura encontrou índices de SOD e CAT mais elevados no micélio e mais baixos nos corpos de frutificação (3-6 vezes maior no micélio para SOD e cerca de 100 vezes maior no micélio para CAT). Para a espécie *A. mellea*, os resultados sugerem a participação de $O_2^{\bullet-}$ na emissão de luz, pois quanto menor a atividade de SOD, maior a intensidade de luz emitida. Níveis altos de CAT no micélio sugerem elevada produção de H_2O_2 , sendo que uma parte poderia ser produzida durante a atividade da SOD. Por outro lado, índices mais baixos de CAT, onde há uma produção significativa de $O_2^{\bullet-}$, sugerem a participação de outras enzimas que degradam peróxido de hidrogênio (GPx, LP e MnP), porém, as atividades destas enzimas não foram determinadas pelos autores.

1.4. ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR METAIS

Metais, essenciais ou não, podem ser introduzidos no meio ambiente por diversas fontes, como depósitos de lixo doméstico, atividades de mineração e rejeitos industriais. A importância de se estudar os efeitos dos metais em sistemas biológicos se dá pela sua não degradabilidade e especiação para íons, complexos

ou moléculas mais tóxicos e consequente acumulação na biota, participando assim da cadeia alimentar. Embora essenciais aos organismos vivos, inclusive aos fungos, metais como cobre e zinco, em altas concentrações, podem resultar em inibição do crescimento e toxicidade (Azevedo *et al.*, 2007). Metais de transição podem atuar como catalisadores na degradação oxidativa de macromoléculas biológicas, o que traduz a natureza da toxicidade intrínseca desses metais aos tecidos (Stohs e Bagchi, 1995).

A toxicidade de metais também pode estar associada à geração de espécies reativas de oxigênio tais como peróxidos e radicais superóxido, hidroxila, alcóxila e alquilperóxila. No fungo ascomiceto, *Saccharomyces cerevisiae* (Ohsumi *et al.*, 1988), a toxicidade por cobre se revela pelo rompimento da membrana de células e organelas. Isso acontece devido à habilidade do cobre em gerar radicais livres que desencadeiam a peroxidação lipídica. Por outro lado, metais como zinco complexam compostos tiólicos, importantes sequestradores de radicais livres, resultando em excesso de EROs e desequilíbrio redox (Azevedo *et al.*, 2007).

No dinoflagelado bioluminescente marinho *Lingulodinium polyedrum*, íons de mercúrio, cádmio, chumbo e cobre causam aumento da oxidação de proteínas e lipídios, aumento nos níveis de SOD, ascorbato peroxidase e β -caroteno e diminuição de GSH (Pinto *et al.*, 2003). O tratamento deste organismo com estes metais induz a expressão da MnSOD e isoformas da FeSOD, enquanto que a atividade da CuZnSOD citossólica não é significativamente alterada. A indução de ambas isoformas presentes em organelas (MnSOD e FeSOD) sugere que ambos os sistemas de transporte de elétrons mitocondrial e cloroplastos são afetados por estes metais (Okamoto *et al.*, 2001). Em algas foi observado o aumento da SOD total após tratamento com cádmio (Okamoto *et al.*, 1996).

O dano à membrana é um importante efeito da toxicidade de metais. A tolerância de certos organismos a metais provavelmente se deve a adaptações celulares, como, por exemplo, liberação de compostos quelantes (Pinto *et al.*, 2003). Entre as proteínas protetoras contra o estresse oxidativo há as quelantes de metal como as metalotioneínas e as fitoquelatinas. A glutatona é necessária na síntese de fitoquelatinas, sendo a enzima responsável por essa síntese ativada por cádmio (Courbot *et al.*, 2004), pelo qual as fitoquelatinas têm grande afinidade (Pinto *et al.*, 2003), assim como por chumbo. O aumento na síntese de fitoquelatinas requer a formação de um complexo entre GSH e um metal de transição, geralmente cádmio. A proteção contra o estresse oxidativo provocado por cádmio e chumbo se dá, em grande parte, pelo aumento de GSH citoplasmático, que atua como antioxidante e quelante. Em fungos, a maior tolerância a metais tem sido atribuída a vários mecanismos de desintoxicação, incluindo o sequestro de metais pelos componentes da parede celular (Azevedo *et al.*, 2007).

O cobre, um elemento essencial, tem a propriedade de ser reduzido por compostos tiólicos e ser oxidado por ferro, produzindo radicais (Stohs e Bagchi, 1995). Atua como catalisador na formação de EROs e inicia a peroxidação de membranas lipídicas. A GSH apresenta um efeito protetor contra cobre, sendo esse efeito atribuído à sua habilidade de estabilizar o cobre no estado de oxidação Cu^+ , inibindo o ciclo redox $\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+}$ e a geração de radicais livres (Milne *et al.*, 1991). Há uma variedade de radicais que podem transferir o elétron desemparelhado para o oxigênio gerando o radical ânion superóxido, entre eles, íons de metais de transição no estado reduzido (Fe^{2+} e Cu^+) (Cadenas, 1989). A SOD é essencial neste sistema para controlar o estresse oxidativo (Stohs e Bagchi, 1995). Um aumento da SOD e GPx em algas foi observado após tratamento com cobre (0 - 100 mM) (Pinto *et al.*,

2003). Observou-se ainda uma progressiva diminuição nos níveis de GSH com o aumento da concentração de cobre em algas (Nagalakshmi e Prasad, 2001). Embora tóxico em altas concentrações, os efeitos do cobre puderam ser atenuados sob condições crônicas porque ele é um micronutriente essencial para a atividade catalítica de várias enzimas, incluindo a citocromo-c oxidase e SOD (Pinto *et al.*, 2003).

O cádmio é um metal abundante e não essencial de grande interesse devido ao seu acúmulo no ambiente como resultado de práticas industriais. Fariss (Fariss, 1991) mostrou que sequestradores de radicais livres e antioxidantes são úteis na proteção contra cádmio. Em ratos tratados com o metal houve um aumento da atividade de GPx, talvez por representar principal resposta protetora antioxidante, enquanto que GR e CAT tiveram um decréscimo na atividade (Koizumi e Li, 1992). A maior parte da resistência ao estresse oxidativo por cádmio se dá pelo aumento de GSH, que atua como antioxidante e quelante. Contudo, em altas concentrações, a depleção de GSH ocorre, possivelmente, devido à produção de EROs a uma velocidade que excede a habilidade desta espécie em ser regenerada (Stohs e Bagchi, 1995).

Quando o nível de EROs excede a capacidade do sistema antioxidante de eliminá-las, o dano a componentes celulares ocorre. Assim, um aumento nos níveis de proteínas e lipídeos oxidados são um indicativo de um estado de estresse oxidativo. Comparações entre os efeitos biológicos de cobre e cádmio indicam que o primeiro é proporcionalmente mais eficiente em causar estresse oxidativo que o último (Pinto *et al.*, 2003). É sugerido que o cobre interage diretamente com a membrana, enquanto o cádmio interfere em outros processos metabólicos, inclusive coordenação a proteínas dependentes de zinco e cálcio. Um aumento na atividade

de peroxidases é considerado um indicador de estresse ou fitotoxicidade potencial de metais (Pinto *et al.*, 2003).

Condições crônicas de estresse oxidativo provocam aumento nas atividades de SOD e GPx. A exposição aguda a metais é altamente devastadora, presumivelmente porque a produção de EROs excede as defesas antioxidantes (Pinto *et al.*, 2003).

1.4.1 Toxicidade de metais em fungos

Algumas das funções dos fungos incluem: (i) decompor materiais orgânicos com a concomitante ciclagem de nutrientes, (ii) atuar como patógeno, (iii) estabelecer uma relação de simbiose com plantas e animais e (iv) degradar materiais sintéticos e naturais, por exemplo, madeira, tinta, couro, alimentos e tecidos (Gadd, 1993).

O mecanismo de tolerância de fungos decompositores a metais não é muito conhecido. Encontram-se, com maior frequência, estudos com leveduras, fungos aquáticos e micorrizas (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2006).

A adaptação de fungos ao estresse oxidativo está fortemente conectada com as mudanças redox-dependentes da atividade de compostos de defesas antioxidantes. Estes organismos podem se desenvolver normalmente na presença de H₂O₂ em concentrações superiores a 1%. Esta propriedade dos fungos permite que eles ocupem diversos nichos ecológicos (Belozerskaya e Gessler, 2007).

A resposta de fungos ectomicorrízeos a metais tóxicos é importante, uma vez que estes organismos estão presentes em locais poluídos, participam de uma relação simbiótica crucial com as árvores e diminuem a toxicidade do metal para as plantas hospedeiras. A expressão de enzimas envolvidas nos mecanismos de

resposta antioxidante é regulada por cádmio em fungos ectomicorrízeos e em raízes micorrízeas. Compostos tiólicos, incluindo GSH, fitoquelatinas e metalotioneínas, são componentes essenciais nas vias de desintoxicação de cádmio em vários organismos (Courbot *et al.*, 2004).

Em fungos, a maior tolerância a metais tem sido atribuída a vários mecanismos de desintoxicação, incluindo o sequestro de metais pelos componentes da parede celular (Azevedo *et al.*, 2007). Nos fungos hifomicetos aquáticos *Heliscus lugdunensis* e *Verticillium* cf. *alboatrum* ocorre aumento adaptativo nos níveis de GSH à exposição ao cádmio, sendo que, em relação ao zinco, os níveis de GSH praticamente não variam (Jaeckel *et al.*, 2005). Nos fungos basidiomicetos de podridão branca, *Abortiporus biennis* e *Cerrena unicolor* (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2006), também ocorre aumento nos níveis de GSH quando expostos ao cádmio. Os níveis de GSH aumentam proporcionalmente com a concentração deste metal (Courbot *et al.*, 2004), reforçando a hipótese de que se trata de uma resposta protetora ao estresse oxidativo induzido pelo metal.

1.5 ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR FENÓIS

Os fungos podem apresentar a capacidade de degradar certos compostos orgânicos, como fenóis, sendo utilizados, inclusive, em processos de biorremediação. No entanto, a partir de determinada concentração, que varia de acordo com o substrato e a espécie de fungo, o efeito tóxico torna-se maior que a capacidade de degradação, levando a danos ao organismo (Leontievsky *et al.*, 2000).

Os fenóis estão entre as classes de poluentes ambientais de maior importância. Fenóis são xenobióticos produzidos por diversas indústrias como

refinarias de petróleo, fabricantes de fungicidas e herbicidas, têxteis, fibras sintéticas, entre outros. Apresentam grande risco à saúde humana, sendo genotóxicos, carcinogênicos e imunotóxicos. O fenol e seus derivados podem entrar no organismo por via alimentar, sistema respiratório ou pele (Bukowska e Kowalska, 2004; Avilez *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008).

Os clorofenóis provocam cheiro e sabor desagradável na água, e são tóxicos a vários organismos aquáticos em concentrações muito baixas. Formam uma das mais perigosas classes de poluentes ambientais por causa da sua alta toxicidade e resistência à degradação, como é o caso das dioxinas, formadas na degradação de fenóis. O 2,4,6-triclorofenol, por exemplo, é usado por muitas indústrias de manufatura de antisépticos, bactericidas, fungicidas, germicidas e é considerado carcinogênico (Leontievsky *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). Radicais fenoílas podem levar à formação de EROs como H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. Um dos efeitos dos fenóis em organismos é a peroxidação lipídica nas membranas celulares (Michalowicz e Duda, 2007).

1.6 ENZIMAS DO METABOLISMO AERÓBIO

O Ciclo do Ácido Cítrico ou Ciclo de Krebs é a mais importante via para produção de energia sob condições aeróbias (Alp *et al.*, 1976). A citrato sintase (CS) é a primeira enzima do ciclo e catalisa a condensação da acetil-coenzima A (acetil-CoA) com oxaloacetato para formar citrato (Esquema 11) (Nelson e Cox, 2000). A determinação da atividade CS é comumente usada como indicador da capacidade de produção de ATP por organismos aeróbios. Quando sua atividade é baixa, há colapso da síntese mitocondrial de ATP e o processo celular de obtenção de energia

é principalmente anaeróbico. Quando a atividade da CS é alta, infere-se que a produção de energia é gerada principalmente via Ciclo do Ácido Cítrico (Alp *et al.*, 1976; Nelson e Cox, 2000; Rajotte e Couture, 2002). Esta via é a principal responsável pela formação de NADH, coenzima que alimenta a cadeia de fosforilação oxidativa e necessária à bioluminescência dos fungos (Oliveira e Stevani, 2009).

A citocromo c oxidase (COX), ou complexo citocromos aa₃, é a enzima final da cadeia respiratória. Transfere elétrons da cadeia para o oxigênio molecular reduzindo-o a água (Figura 4) (Nelson e Cox, 2000). É considerada a enzima chave na cadeia de transporte de elétrons e como os demais citocromos carreadores de elétrons, está localizada na membrana interna mitocondrial. Ao determinar a atividade da COX pode-se observar quão eficiente é a respiração celular. Alta atividade de COX sugere aumento no consumo potencial de oxigênio e baixa atividade indica dano mitocondrial (Craig *et al.*, 2007).

Figura 4. Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Fonte: Wikipédia).

A enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (GP6D), da via das pentoses-fosfato, catalisa uma das principais reações responsáveis por formar NADPH, necessário à bioluminescência de fungos. É a primeira enzima da via e catalisa a desidrogenação da glicose 6-fosfato, formando 6-fosfoglicono- δ -lactona, reduzindo NADP^+ a NADPH (Nelson e Cox, 2000).

2 OBJETIVOS

Busca-se elucidar as conexões metabólicas entre bioluminescência e defesas antioxidantes de fungos bioluminescentes, uma vez que ambos os processos são dependentes do oxigênio molecular e vitais ao desenvolvimento e manutenção destes organismos. Para tanto, propõe-se determinar e comparar os perfis de bioluminescência, viabilidade celular e enzimas de defesa antioxidante e ligninolíticas nos corpos de frutificação e nos micélios das espécies *Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes* à medida que a cultura envelhece. Através do efeito da exposição do fungos a indutores de estresse químico (metais e fenóis) na emissão de luz, viabilidade celular, defesas antioxidantes e enzimas de respiração celular no fungo bioluminescente *G. viridilucens*, vislumbra-se corroborar a interdependência de inibição da bioluminescência com os danos e repostas adaptativas do organismo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DOS CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO

Os corpos de frutificação dos fungos bioluminescentes *Gerronema viridilucens* e *Mycena lucentipes* (Figura 5) foram coletados no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), nos anos de 2006 e 2007, durante a noite, sendo prontamente armazenados em nitrogênio líquido. Embora ambas as espécies emitam luz nos corpos de frutificação, a intensidade e local de emissão podem variar entre as espécies. No caso das estudadas, *G. viridilucens* emite luz apenas no píleo (“chapéu”) enquanto que *M. lucentipes* emite apenas no estipe (“caule”). A aparente luz emitida pelo píleo de *M. lucentipes* é na verdade reflexo da emissão do estipe da espécie.

Figura 5. Corpos de frutificação dos fungos *Gerronema viridilucens* no claro (A) e escuro (B) e *Mycena lucentipes* no claro (C) e escuro (D), coletados no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira, SP.

3.2 CULTIVO DO MICÉLIO

Os fungos *G. viridilucens* e *M. lucentipes* foram cultivados em agar 2,0% (m:v), contendo 1,0% (m:v) de melaço de cana-de-açúcar, 0,10% (m:v) de extrato de levedura, em pH 6,0 (pH normal da solução sem tampão). O meio foi autoclavado a 130°C e deixado para esfriar até, aproximadamente, 40°C, quando então foram transferidos 3,0 mL do meio para cada placa de Petri de 35 mm, com auxílio de um conta-gotas estéril dentro do fluxo laminar. Após as placas esfriarem, depositou-se um fragmento de inóculo de 3,5 mm em cada uma, obtido da perfuração com um fura-rolhas, de uma placa anteriormente preparada, cerca de 20 dias antes, de 100 mm, contendo o micélio luminescente. O fungo foi transportado para as placas, com o auxílio de uma pinça metálica, próximo ao rubro da chama de um bico de Bunsen (Figura 6). Após a inoculação, as placas foram fechadas com filme de PVC e acondicionadas em uma câmara climatizada WT Binder a 25°C e 90% de umidade. As placas foram mantidas nestas condições até os ensaios.

Figura 6. Esquema de cultivo dos fungos: (A) esterilização do fura-rolhas e pinça metálica, (B) perfuração do meio de cultura na placa de 100 mm, (C) transferência do inóculo para as placas de 35 mm com auxílio de uma pinça metálica e (D) placa de 35 mm inoculada.

3.3 MEDIÇÃO DA BIOLUMINESCÊNCIA

Para medir a luz emitida pelo micélio nas placas de 35 mm foi necessário desenvolver um suporte especial, utilizando um material não transparente (Figura 7). O suporte desenvolvido foi idealizado a partir de um suporte convencional de 96 poços. Para monitorar a luz emitida pelo micélio do fungo, o suporte foi colocado no luminômetro com as seis placas, sendo a luz medida por um tempo de integração de 2,0 s por poço. Cada uma das 6 placas é limitada por 8 poços na horizontal e 8 poços na vertical, obtendo-se assim, a integral pela somatória dos 64 poços referentes a cada placa. Como o aparelho faz medições para placas de 384 poços, obtém-se um gráfico 3D da superfície das placas, semelhante a uma fotografia “quantificada” da luz emitida por cada placa de Petri de 35 mm.

Figura 7. Suportes para medição da bioluminescência em placas de 35 mm.

3.4 REAGENTES

Melaço de cana-de-açúcar (alimentício, 82,2°Bx, Pol 56%) e extrato de levedura (Oxoid), ágar (Ágar Brasileiro Ind. Com.) foram adquiridos e utilizados sem purificação prévia. H_2SO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaOH , NaHCO_3 , H_2O_2 (30%), NaCl , etanol, ácido fórmico e acetonitrila, todos P.A.

da Merck. $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, *N*-etilmaleimida (NEM), Triton X-100, DTPA, EDTA, glutationa redutase (GR), glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), *t*-butil-hidroperóxido 70% (*t*-BOOH), xantina oxidase, xantina, ferricitocromo *c*, 2,4,6-triclorofenol, ácido tartárico, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e acetato de amônio foram comprados da Sigma-Aldrich. Fenol foi adquirido da Synth e β -NADPH da ICN Biomedicals. Ácido malônico da Acros Organics. Metanol foi comprado da Merck. Reagente de Bradford e albumina de soro bovino, da BioAgency. Álcool veratrílico (Sigma-Aldrich) foi previamente purificado por destilação a vácuo (180°C a 1,5 mmHg) e mantido sob atmosfera de argônio a -20°C até o uso.

3.5 MATERIAIS

Para a preparação dos meios de cultura, usou-se uma autoclave vertical Phoenix nas condições: 30 min, 130°C e 1,5 kgf/cm² de pressão. Após autoclavagem os meios de cultura foram levados ao fluxo laminar Trox Technik, onde as placas foram preparadas. Após a inoculação, as placas foram armazenadas em estufa WT Binder a 25°C e 90% de umidade, condições estas previamente otimizadas para o fungo *G. viridilucens* pelo grupo (Mendes *et al.*, 2008) e *M. lucentipes*. Para a preparação de homogenatos, utilizou-se uma centrífuga Eppendorf 5804R, e um homogeneizador Potter-Elvehjem. Os ensaios enzimáticos foram realizados em um espectrofotômetro Hitachi U-2010, munido de banho termostaticador e agitador magnético para cubetas. A otimização das condições de cultura para o fungo *M. lucentipes* foi realizada com o luminômetro de microplacas Tecan Infinite M200. As análises de GSH e GSSG foram realizadas em

cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent, modelo 1200 acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo híbrido íon-trap linear Applied Biosystems modelo 3200 Q Trap.

3.6 ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR METAIS E FENÓIS

Os ensaios de estresse químico foram realizados com culturas do fungo *G. viridilucens*, aplicando-se soluções de sulfato de cádmio, sulfato de cobre, fenol ou 2,4,6-triclorofenol. No 10º dia de inoculação foi realizada a medida da luz, sendo 3 placas de 35 mm utilizadas para o controle e 3 para cada metal ou fenol testado. Em seguida, sobre o micélio, foram aplicados 500 µL de uma solução 0,05% (m:v) de Triton X-100 para o controle ou 500 µL da solução do metal ou fenol, preparada em 0,05% de Triton X-100. Os testes foram realizados na concentração de EC₅₀ (concentração mediana efetiva), determinadas pelo grupo anteriormente, de 3,0 mM (Cd²⁺) e 8,1 mM (Cu²⁺) (Mendes e Stevani, 2010), 5,10 mM (fenol) e 0,78 mM (2,4,6-triclorofenol) (informação verbal).¹ As placas foram acondicionadas novamente em câmara climatizada e, 24 h após a aplicação do metal ou fenol, a luz foi medida novamente. O micélio foi então lavado com água deionizada e congelado em nitrogênio líquido, para posterior uso nas análises. A variação percentual da bioluminescência foi calculada, para cada placa individualmente, a partir da bioluminescência inicial (BL_{0h}) e após as 24 h (BL_{24h}) em contato com o metal ou fenol [BL = (BL_{24h}/BL_{0h}) x 100].

¹ Fornecida pelo Dr. Luiz Fernando Mendes no Instituto de Química USP em 2009.

3.7 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Uma massa média de 100 mg de corpos de frutificação congelados em nitrogênio líquido ou micélio proveniente de cerca de 3 placas de Petri de 35 mm foi homogeneizada com 1,0 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,0 por 1 min, utilizando-se um Potter-Elvehjem. Após a homogeneização, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 4°C e 10.640 x g. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos, com exceção da COX.

Para a determinação da atividade da enzima COX, foram adaptados os procedimentos descritos na literatura para extração de mitocôndrias (Nelson e Cox, 2000; Miwa *et al.*, 2003; Gredilla *et al.*, 2006). O tampão de extração utilizado foi composto por Tris-HCl 5 mM, sacarose 200 mM, EGTA 2 mM e albumina de soro bovino 1%, pH final 7,4. O micélio cultivado em cerca de 3 placas de Petri de 35 mm foi homogeneizado neste tampão em Potter-Elvehjem. Em seguida a suspensão foi centrifugada por 10 min a 4°C e 1000 x g. O sobrenadante foi retirado e novamente centrifugado por 20 min e 2000 x g. Após esta segunda centrifugação, o pellet foi lavado e ressuspenso no tampão, desta vez sem albumina, para não interferir na quantificação de proteína, e utilizado no ensaio.

O conteúdo proteico do extrato utilizado para os ensaios enzimáticos foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando cinco alíquotas de albumina de soro bovino (20-100 µL, 0,10 mg/mL), 200 µL de reagente de Bradford e água para completar 1,0 mL, fazendo-se a leitura em 595 nm. Após construir a curva de calibração, a proteína foi determinada em 10 µL de homogenato adicionado a 790 µL de água e 200 µL do reagente de Bradford.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.8.1 Determinação de catalase (CAT)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, contendo 980 μL de uma solução de H_2O_2 10 mM, em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, foram adicionados 20 μL de homogenato. Logo que a amostra foi adicionada, a absorbância foi monitorada por 1 min, sendo a leitura realizada em 240 nm, à temperatura ambiente, e sob agitação magnética. A atividade de CAT foi determinada multiplicando-se o valor da inclinação da reta por 1000 (ajuste do volume do ϵ de L para mL), pelo fator de diluição de 50 vezes (20 μL de homogenato em 1,0 mL) e dividindo-se pelo coeficiente de absortividade molar do peróxido de hidrogênio ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), para, finalmente, obter a atividade em unidade/min (Aebi, 1984). Uma unidade de CAT é definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1,0 μmol de H_2O_2 por minuto (Esquema 12).

Esquema 12. Reação monitorada na determinação da atividade de CAT.

3.8.2 Determinação de superóxido dismutase (SOD)

O meio reacional foi preparado com 25 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, contendo 0,10 mM EDTA, 10 mL de solução 10 mM de NaOH, 0,76 mg de xantina e 6,2 mg de ferricitocromo c. Preparou-se, a parte, uma solução 0,50 U/mL de xantina oxidase (25 U/mL). Como esta enzima degrada-se muito facilmente sob estocagem, é necessário, primeiramente, verificar a sua atividade. Para tanto, adicionam-se volumes diferentes da solução descrita de xantina oxidase ao de meio de reação e

monitora-se a variação da absorbância em 550 nm, a 25°C, por 3 min. O volume de xantina oxidase que se deve utilizar no ensaio é aquele que fornece uma reta de coeficiente angular em torno de $0,025 \text{ min}^{-1}$. O volume final foi sempre de 1,0 mL. O ensaio de SOD é efetuado adicionando-se a uma cubeta, contendo 700 μL de meio reacional e 5 μL de homogenato, o volume de xantina oxidase encontrado no teste anterior. O volume final foi sempre 1,0 mL. Monitorou-se a absorbância em 550 nm, a 25°C, por 3 min. A atividade de SOD foi obtida através da determinação das inclinações das retas, com e sem homogenato. Calculou-se a inibição percentual através da relação $100 (1-k_{\text{inh}}/k)$ e, finalmente, determinou-se a atividade de SOD através do valor em 50% de inibição, multiplicando-se pelo fator de diluição do homogenato. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade necessária para inibir a redução do ferricitocromo c em 50% (Esquema 13) (Flohe e Otting, 1984).

Esquema 13. Reação monitorada na determinação da atividade de SOD.

3.8.3 Determinação de glutathiona peroxidase (GPx)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, contendo 550 μL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, foram adicionados 50 μL de homogenato, 100 μL de GR 2,4 U/mL e 100 μL de GSH 10 mM. Este meio foi incubado por 10 min a 37°C. Após

este período, adicionou-se 100 μL de NADPH e a absorbância foi monitorada por 3 min em 340 nm, a 37°C. Em seguida foram adicionados 100 μL de *t*-butil hidroperóxido, que dispara a reação, e a absorbância foi, novamente, monitorada por mais 5 min à mesma temperatura. A atividade da GPx é determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absorvidade molar do NADPH ($\epsilon_{\text{NADPH}}^{340\text{nm}} = 6.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000, pelo fator estequiométrico de 2 e pelo fator de diluição de 20 vezes (50 μL de homogenato em 1,0 mL) (Flohe e Gunzler, 1984). Uma unidade de GPx é definida como a quantidade necessária para oxidar 1,0 μmol de NADPH por minuto (Esquema 14).

Esquema 14. Reação monitorada na determinação da atividade de GPx.

3.8.4 Determinação de glutathiona redutase (GR)

Preparou-se o meio reacional, contendo 10,0 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,6, com EDTA 0,50 mM, NADPH 0,10 mM e GSSG 1,0 mM. Após a adição de todos os reagentes, aguardou-se 10 min. A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados, então, 950 μL do meio reacional descrito e 50 μL do homogenato. A absorbância foi monitorada em 340 nm, a 30°C por 5 min. A atividade da GR é determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absorvidade molar do NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 20 vezes (50 μL de homogenato em 1,0 mL) (Carlberg e Mannervik, 1975). Uma unidade de GR é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1,0 μmol de NADPH por minuto (Esquema 15).

Esquema 15. Reação monitorada na determinação da atividade de GR.

3.8.5 Determinação de glutathiona S-transferase (GST)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados 960 μL de tampão fosfato 100 mM, pH 6,5 contendo DTPA 5,0 mM, 10 μL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 100 mM em etanol, 10 μL de GSH 100 mM em tampão e 20 μL de homogenato. A absorbância foi monitorada por 1 min em 340 nm, a 25°C. A atividade da GST é determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absorvidade molar do aduto GS-DNB ($\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 50 vezes (20 μL de homogenato em 1,0 mL) (Habig *et al.*, 1974). Uma unidade de GST é definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1,0 μmol do aduto GS-DNB por minuto (Esquema 16).

Esquema 16. Reação monitorada na determinação da atividade de GST.

3.8.6 Determinação de manganês peroxidase (MnP)

Preparou-se o meio de reação contendo tampão malonato 50 mM, pH 4,5 H_2O_2 0,10 mM e MnSO_4 200 mM. A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados 980 μL do meio de reação e disparou-se a reação com 20 μL de homogenato. A absorbância foi acompanhada em 270 nm, a 25°C, por 3 min.

Monitorou-se a formação do complexo Mn(III)-malonato ($\epsilon = 11.590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Wariishi *et al.*, 1992). A atividade da MnP é determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absortividade molar do produto e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 50 vezes. Uma unidade de MnP é definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de $1,0 \text{ } \mu\text{mol}$ de Mn(III)-malonato por minuto (Esquema 17).

Esquema 17. Reação monitorada na determinação da atividade de MnP.

3.8.7 Determinação de lignina peroxidase (LP)

A uma cubeta de quartzo de $1,0 \text{ mL}$ foram adicionados $850 \text{ } \mu\text{L}$ de tampão tartarato 100 mM , $\text{pH } 3,0$, $25 \text{ } \mu\text{L}$ de H_2O_2 20 mM , $25 \text{ } \mu\text{L}$ de álcool veratrílico 16 mM , disparando-se a reação com $100 \text{ } \mu\text{L}$ de homogenato. A absorbância foi monitorada em 310 nm , a 30°C , por 2 min . A atividade da LP foi então determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absortividade molar do veratraldeído ($\epsilon = 9.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 10 vezes. Uma unidade de LP é definida como a quantidade de enzima que forma $1,0 \text{ } \mu\text{mol}$ de veratraldeído por minuto, a 30°C , em tampão tartarato 100 mM , $\text{pH } 3,0$ (Esquema 18) (Tien e Kirk, 1984).

Esquema 18. Reação monitorada na determinação da atividade de LP.

3.8.8 Determinação de Lacase (LAC)

A metodologia para determinação de LAC foi desenvolvida a partir de uma compilação de várias referências citadas a seguir. A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL, contendo 850 μL de tampão fosfato 50 mM (Chefetz *et al.*, 1998), pH 6,0 (para minimizar a oxidação não enzimática do catecol) (Zlateva *et al.*, 1996) e 10 μL de catecol 1,0 mM (Dedeyan *et al.*, 2000) (20 vezes o valor do K_M para *Ganoderma lucidum*) (Kumari e Sirsi, 1972), foram adicionados 50 μL de homogenato. A absorbância foi monitorada em 400 nm (Zlateva *et al.*, 1996), a 30°C, por 3 min. A atividade de LAC é determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absorvidade molar da o-quinona formada ($\epsilon = 1417 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Zlateva *et al.*, 1996) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 20 vezes. Influências como ação de peroxidases (LP e MnP) sobre a oxidação do catecol foram consideradas e eliminadas, mediante a adição de CAT 10 U/mL (concentração final) no homogenato e acompanhamento da absorção durante os primeiros 60 s de ensaio. Uma unidade de LAC é definida como a quantidade necessária para oxidar 1 μmol de catecol a o-quinona por minuto (Esquema 19).

Esquema 19. Reação monitorada na determinação da atividade de LAC.

3.8.9 Determinação de citrato sintase (CS)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados 650 μL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,1, 100 μL de DTNB, 100 μL de acetil-CoA, 50 μL de homogenato e 100 μL de oxaloacetato. A absorbância foi monitorada por 3 min em

412 nm, a 25°C. A atividade da CS é determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absortividade molar do tiofenol ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 20 vezes (50 μL de homogenato em 1,0 mL) (Srere *et al.*, 1963; Alp *et al.*, 1976). Uma unidade de CS é definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1,0 μmol do tiofenol por minuto (Esquema 20).

Esquema 20. Reação monitorada na determinação da atividade de CS.

3.8.10 Determinação de citocromo c oxidase (COX)

O citocromo c comercial, na forma oxidada, foi previamente reduzido com solução de ascorbato de sódio 1 mg/mL. A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados 885 μL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, 100 μL de citocromo c reduzido 50 mM e 15 μL de homogenato. A absorbância foi monitorada por 2 min em 550 nm, a 37°C. A atividade COX foi determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absortividade molar do citocromo c ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 67 vezes (15 μL de homogenato em 1,0 mL) (Gianni *et al.*, 2004; Menna-Barreto *et al.*, 2009). Uma

unidade de COX é definida como a quantidade de enzima necessária para a oxidação de 1,0 μmol de citocromo c por minuto (Esquema 21).

Esquema 21. Reação monitorada na determinação da atividade de COX.

3.8.11 Determinação de glicose 6-fosfato desidrogenase (GP6D)

A uma cubeta de quartzo de 1,0 mL foram adicionados 920 μL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,1, 10 μL de NADP^+ dissódico 40 mM, 10 μL de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 500 mM, 50 μL de glicose 6-fosfato 100 mM e 10 μL de homogenato. A absorbância foi monitorada por 5 min em 340 nm, a 30°C. A atividade da GP6D é determinada dividindo-se a inclinação da reta obtida pelo coeficiente de absorvidade molar do NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e multiplicando-se por 1000 e pelo fator de diluição de 100 vezes (10 μL de homogenato em 1,0 mL) (Azevedo *et al.*, 2007). Uma unidade de G6PD é definida como a quantidade de enzima necessária para a redução de 1,0 μmol do NADP^+ por minuto (Esquema 22).

Esquema 22. Reação monitorada na determinação da atividade de G6PD.

3.9 PERFIL DA BIOLUMINESCÊNCIA

Assim como no estudo da espécie *G. viridilucens* (Mendes *et al.*, 2008), a bioluminescência do fungo *M. lucentipes* foi monitorada usando-se 20 placas, desde a inoculação. As medidas foram realizadas diariamente, em cada placa, conforme

descrito no item 3.3. O objetivo foi conhecer o perfil da bioluminescência, o tempo em que a intensidade de luz atinge o ponto máximo e, se há um período em que a bioluminescência permanece constante. É necessário conhecer este período para realizar experimentos que relacionem a inibição de luz com estresse químico.

3.10 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O método empregado foi adaptado a partir da literatura e baseado na formação de cristais de formazana a partir do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Esquema 23) (Levitz e Diamond, 1985; Krishnan *et al.*, 2005). O micélio dos fungos *G. viridilucens* e *M. lucentipes* foram cultivados no escuro, a 25°C e 90% de umidade, usando uma câmara climática, em frascos Erlenmeyer com 50 mL de meio de cultura contendo 1,0% de melaço de cana-de-açúcar e 0,10% de extrato de levedura. Depois de 8, 10, 13, 17 ou 20 dias de inoculação no meio líquido, o micélio foi lavado e pesado, e um meio de cultura novo, sem micélio, foi autoclavado por 30 min. Após esfriar, 50 µL de MTT (10 mg/mL) foram adicionados em 2950 µL do meio de cultura autoclavado. O micélio, previamente pesado, foi adicionado a esse meio e a mistura foi mantida em câmara climática a 35°C por 3 h. O micélio foi então retirado e homogeneizado em 1 mL de DMSO usando um Potter-Elvehjem para solubilizar os cristais de formazana formados, rendendo uma solução violeta. Esta solução foi então centrifugada a 15°C, 2800 x g por 5 min. Três alíquotas do sobrenadante (250 µL) foram transferidas para poços de uma microplaca e a absorbância foi monitorada em 570 nm. Quanto maior a absorbância, maior a viabilidade celular. Os resultados foram normalizados pela maior absorbância. Todos os valores foram expressos como média ± desvio padrão

de, pelo menos, três experimentos independentes. Para avaliar a viabilidade celular em fungos tratados com metais ou fenóis, ambos foram adicionados ao meio líquido no 10^o dia de inoculação, a concentração final foi a mesma do EC₅₀. Após 24 h, o micélio foi lavado e o procedimento descrito acima foi realizado.

Esquema 23. Reação utilizada no teste de viabilidade celular.

3.11 DETERMINAÇÃO DE GSH E GSSG

A determinação de GSH e GSSG foi realizada em HPLC/MS do tipo triplo quádruplo híbrido íon-trap. As amostras foram preparadas homogeneizando-se o micélio de 3 placas ou cerca de 100 mg de cogumelo congelado em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 utilizando-se um Potter-Elvehjem. Previamente à homogeneização, *N*-etilmaleimida (NEM) foi adicionado ao meio para impedir a oxidação da GSH, através de uma adição de Michael (Esquema24).

Esquema 24. Derivatização da GSH com NEM.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna com preenchimento de C18, com fase móvel **A**: metanol/água (65:35), 5,0 mM de acetato de amônio e 0,10% de ácido fórmico e fase móvel **B**: água com 5,0 mM de acetato de amônio e 0,10% de ácido fórmico. O fluxo usado foi de 0,90 mL/min, com gradiente de solventes de: 100% de B por 30 s, de 30 s a 2 min 0% de B, condição que foi mantida até os 5 min, voltando para a condição inicial após 5 min. A corrida tem duração de 12 min. A análise por espectrometria de massas foi feita utilizando o método “multiple reaction monitoring (MRM)”, em que, após a ionização da amostra na fonte de ionização, filtrou-se no primeiro quadrupolo do equipamento apenas os íons de massa/carga correspondentes aos analitos de interesse. No caso, os íons m/z 433,1 (GSH + *N*-etilmaleimida + H^+) e m/z 613,2 (GSSG + H^+). Portanto, apenas estes dois íons passam do primeiro quadrupolo para o segundo, onde foram fragmentados e os fragmentos gerados foram filtrados no terceiro quadrupolo para que apenas os fragmentos específicos de cada analito chegassem ao detector que gera o sinal no equipamento. Esta metodologia, ainda não publicada, foi desenvolvida no laboratório do Prof. Dr. Pio Colepicolo (IQ-USP), onde foram feitas as análises.

3.12 CONDIÇÕES DE CULTURA PARA *Mycena lucentipes*

As mesmas condições de cultura para o fungo *G. viridilucens* previamente otimizadas foram utilizadas para o fungo *M. lucentipes* através de uma análise fatorial multivariada (Mendes *et al.*, 2008). Os fatores dos níveis escolhidos são apresentados na Tabela 2, em 3 níveis: baixo, médio e alto, totalizando 28 experimentos. Os meios de cultura foram preparados como descrito na parte

experimental. A bioluminescência de cada placa foi acompanhada em função do tempo de incubação por 21 dias, utilizando um suporte de 4 poços e luminômetro de microplaca. Para calcular o efeito de interação dos fatores foi utilizado o programa Statistica 6 (Statsoft Inc., 2002), com auxílio do Prof. Dr. Erick L. Bastos, na época docente da Universidade Federal do ABC.

Tabela 2. Planejamento fatorial com 28 experimentos para estudar os efeitos da temperatura, pH, melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura, na emissão de luz e crescimento do fungo *M. lucentipes* em placa de Petri de 35 mm.

Fator	Nível baixo	Nível médio	Nível alto
pH	4,0	6,0	8,0
Temperatura (°C)	20	25	30
Melaço de cana-de-açúcar % (m:v)	0,1	1	10
Extrato de levedura % (m:v)	0,001	0,01	1

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas com o teste *t* de Student com intervalo de confiança de 95% (nível de significância de 5%). Nos estudos de variação da atividade enzimática com o tempo, comparou-se um dia em relação ao seguinte, para se constatar aumento ou diminuição das atividades. Para os experimentos com metais ou fenóis, a análise foi realizada em relação ao controle. As variações significativas são indicadas com asterisco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA DE *M. lucentipes*

O tratamento estatístico realizado com o auxílio do Prof. Dr. Erick L. Bastos (UFABC/USP) não permitiu concluir qual proporção de nutrientes leva à maior emissão de luz para este fungo. Os experimentos foram realizados 4 vezes em triplicata. O método utilizado foi o mesmo que para a espécie *G. viridilucens* (Mendes *et al.*, 2008), cujos resultados foram satisfatórios. Desta forma, optou-se por cultivar a espécie nas mesmas condições ótimas encontradas para *G. viridilucens*, mesmo porque, apesar de não ser possível obter resultados estatisticamente confiáveis, nestas condições, 1,0% de melaço, 0,10% de levedura, pH 6,0 e 25°C, a emissão de luz da espécie *M. lucentipes* é alta em comparação às outras condições testadas.

4.2 PERFIL DE BIOLUMINESCÊNCIA

Medidas previamente realizadas (Mendes *et al.*, 2008) mostraram que a intensidade de luz na cultura do fungo *G. viridilucens* varia desde a inoculação até o 20º dia (Figura 8). Com o perfil de bioluminescência encontrado pôde-se determinar quando poderiam ser realizados os experimentos para investigar possíveis alterações na bioluminescência e atividade enzimática no micélio sob estresse químico. Optou-se pela fase estacionária, entre o 8º e o 11º dia, em que a intensidade da bioluminescência é praticamente constante e maior.

Figura 8. Dependência da intensidade de bioluminescência (BL) do micélio cultivado de *G. viridilucens* em função do tempo de inoculação (n = 6).

Para o fungo *M. lucentipes*, assim como na cultura do fungo *G. viridilucens*, desde a inoculação até o 21º dia, ocorre variação na intensidade de luz. Não foi possível observar, entretanto, um padrão para todas as placas. Ao todo foram testadas cerca de 20 culturas, divididas em três experimentos, seis delas são mostradas na Figura 9.

Figura 9. Perfil da bioluminescência no fungo *M. lucentipes* em culturas monitoradas do 1º ao 21º dia de cultivo (n = 9).

Foram obtidas diferentes respostas para o período em que a emissão é máxima e o período em que a bioluminescência permanece constante, diferentemente do fungo *G. viridilucens*, que apresenta o máximo em torno de 10 dias e a bioluminescência é relativamente estável entre o 8º e o 11º dia (Figura 8). Em algumas culturas a luz tem picos de intensidade, em outros ela aumenta constantemente à medida que o fungo cresce. Apesar de o perfil ser bastante heterogêneo de uma placa em relação a outra, na maior parte dos casos a luz atinge o máximo de intensidade no 20º dia, após o qual começa a diminuir. Algumas culturas apresentaram certa estabilidade na intensidade de luz por volta do 10º-dia. Esses resultados indicam que não se pode prever um período de cultivo onde a luz seja constante e intensa para a realização de medidas que relacionem os níveis enzimáticos com a emissão de luz. A princípio, contava-se apenas com culturas das espécies *G. viridilucens* e *M. lucentipes*, razão pela qual foram escolhidas para este projeto, visando realizar os experimentos com as duas espécies e comparar os resultados. Percebeu-se que o comportamento das duas, em relação à emissão de luz, é diferente. Desta forma, optou-se por realizar os testes de estresse químico apenas com a espécie *G. viridilucens*, uma vez que o objetivo central do projeto era investigar o efeito de metais e fenóis sobre a bioluminescência de fungos e estabelecer relações metabólicas entre bioluminescência e balanço redox diretamente associado ao oxigênio molecular.

4.3 VIABILIDADE CELULAR

Partindo-se da premissa de que a inibição da bioluminescência, um processo essencialmente aeróbio, por uma substância tóxica é um sinal de dano ao

organismo, a determinação da viabilidade celular seria uma forma de avaliar se realmente ocorre dano celular ou proteção do organismo da ação deletéria destes compostos. No entanto, existe a necessidade de se adaptar para o micélio do fungo um método que é usado para culturas de células. Há poucos trabalhos na literatura que discutem ensaios de viabilidade celular para fungos do tipo levedura (unicelulares) (Levitz e Diamond, 1985; Krishnan *et al.*, 2005) e nenhum para fungos multicelulares basidiomicetos. Desta forma, fez-se necessário adaptar-se o ensaio padrão com sal de tetrazólio (MTT) para as espécies *G. viridilucens* e *M. lucentipes*.

Como pode ser observado na Figura 10, o perfil temporal de viabilidade celular de *G. viridilucens* é similar ao seu perfil de bioluminescência (Figura 8). Isto reforça a noção de que a diminuição da bioluminescência é um sinal de dano metabólico ou envelhecimento do organismo, pois a viabilidade celular é maior no mesmo período em que a intensidade da bioluminescência é maior e diminui quando a bioluminescência perde intensidade. A intensidade de luz é maior no 10^o dia, exatamente quando a viabilidade celular alcança seu valor máximo.

Figura 10. Perfil temporal de viabilidade celular do fungo bioluminescente *G. viridilucens* em cultura (n = 9).

A Figura 10 mostra que a viabilidade celular de *G. viridilucens*, assim como de *M. lucentipes* (Figura 11), alcança seu máximo no 10º dia. Porém, a partir do 13º dia, a viabilidade celular desta última cai mais rapidamente que a da espécie *G. viridilucens* e o seu perfil de bioluminescência (Figura 9) difere daquele de viabilidade celular. Ao que parece, a espécie *M. lucentipes* não apresenta um perfil regular de luz, o que pode ter tornado difícil a análise estatística para otimização das condições de cultura. Este comportamento irregular pode ter sido o responsável pela grande variação no perfil da bioluminescência encontrado em diferentes placas desta espécie.

Figura 11. Perfil temporal de viabilidade celular do fungo bioluminescente *M. lucentipes* em cultura (n = 9).

4.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Há apenas um trabalho na literatura, de Shimomura (Shimomura, 1992), sobre correlações entre a emissão de luz e atividades enzimáticas antioxidantes de fungos bioluminescentes. Shimomura estudou a relação entre intensidade de

emissão de luz e atividades de CAT e SOD, utilizando os fungos *Armillaria mellea*, *Mycena citricolor*, *Mycena lux-coeli*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus* e *Pleurotus japonicus*, tendo observado que a atividade SOD e CAT era maior no micélio que nos corpos de frutificação. Os resultados obtidos com *A. mellea* sugeriram a participação de $O_2^{\cdot-}$ na emissão de luz, devido à alta intensidade de luz observada, quando a atividade SOD era baixa. Essa observação também poderia ser interpretada como resultado de menor velocidade de consumo de oxigênio pela cadeia respiratória, disponibilizando mais oxigênio molecular para a reação bioluminescente. Uma maior atividade CAT no micélio que no corpo de frutificação assinala uma alta produção de H_2O_2 , em parte pela atividade SOD. Por outro lado, baixa atividade CAT, paralela à significativa produção de $O_2^{\cdot-}$, poderia indicar co-adjuvância de outras peroxidases cuja atividade não foi determinada pelo autor.

Quando os experimentos foram realizados, o mecanismo proposto por Shimomura sugeria que a bioluminescência origina-se da oxidação não enzimática da luciferina fúngica, patrocinada pelo radical $O_2^{\cdot-}$ (Shimomura, 1992). Ressaltamos aqui que, contrastando com esta hipótese, o máximo de intensidade luminosa coincide com o máximo na atividade SOD para a maioria das espécies estudadas. Em 2009, o envolvimento de uma luciferase na bioluminescência de fungos foi evidenciada (Oliveira e Stevani, 2009), confirmando assim a natureza enzimática da bioluminescência fúngica, proposta nos anos 60 (Airth e Foerster, 1962) com base no teste clássico de Dubois com extratos “quentes” (fervidos, ricos em substrato) e “frios” (resfriados, ricos em enzima) de extratos de órgãos fotogênicos de insetos. Nossos resultados justificam a reavaliação de possível envolvimento de $O_2^{\cdot-}$ na bioluminescência de fungos e eventual participação de SOD e CAT.

As atividades enzimáticas antioxidantes e ligninolíticas e níveis de glutathiona reduzida e oxidada determinados nos corpos de frutificação das espécies estudadas de fungos bioluminescentes são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros enzimáticos antioxidantes e ligninolíticos e níveis de glutathiona dos corpos de frutificação congelados dos fungos bioluminescentes *G. viridilucens* e *M. lucentipes*.

Enzimas de defesa antioxidante	Atividade (U/mg proteína) ^a	
	<i>G. viridilucens</i> (corpos de frutificação)	<i>M. lucentipes</i> (corpos de frutificação)
CAT	525 ± 177	210 ± 21
SOD	402 ± 69	360 ± 36
GPx	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3
GR	0,18 ± 0,09	0,33 ± 0,12
GST	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,01
Enzimas ligninolíticas		
LP	0	0,009 ± 0,001
MnP	0,047 ± 0,004	0,09 ± 0,02
LAC	0,15 ± 0,06	0,5 ± 0,1
Glutathiona (ng/mg proteína)^a		
GSH	108 ± 29	393 ± 32
GSSG	55 ± 12	87 ± 5

^a n=9.

A atividade de CAT é maior na espécie *G. viridilucens*, enquanto SOD, GPx e GST não variam de uma espécie para outra e a atividade GR bem como os níveis de glutathiona são maiores na espécie *M. lucentipes*. As enzimas de atividade ligninolítica apresentam atividade baixa ou inexistente (LP na espécie *G. viridilucens*), como esperado pelo fato de estas enzimas serem extracelulares, produzidas e excretadas pelo micélio para degradar a lignina (Morozova *et al.*, 2007).

É interessante notar que nos dois fungos, aparentemente, a CAT é mais importante que GPx na eliminação de H_2O_2 , o que é consistente com as atividades relativamente baixas de GPx e das enzimas coadjuvantes GR e GST e relativamente altas relações GSH/GSSG (2 a 4 vezes).

A Tabela 4 traz a variação na atividade de enzimas de defesa antioxidante e ligninolíticas e níveis de glutatona reduzida e oxidada nos micélios das espécies *G. viridilucens* e *M. lucentipes* em culturas de 8 a 20 dias.

Tabela 4. Parâmetros enzimáticos antioxidantes e ligninolíticos e níveis de glutatona em micélio dos fungos bioluminescentes *G. viridilucens* e *M. lucentipes* em culturas de 8 a 20 dias.

Enzimas de defesa antioxidante	Atividade (U/mg proteína) ^a				
	<i>G. viridilucens</i>				
	Tempo (dias)	8	10	13	17
CAT	1188 ± 264	771 ± 69*	1041 ± 108*	756 ± 123*	1617 ± 99*
SOD	606 ± 120	387 ± 111*	438 ± 24	372 ± 12*	468 ± 183
GPx	0,63 ± 0,14	0,54 ± 0,19	1,41 ± 0,29*	1,69 ± 0,15*	0,39 ± 0,21*
GR	0,35 ± 0,04	0,29 ± 0,03*	0,33 ± 0,04*	0,42 ± 0,15	0,36 ± 0,08
GST	0,57 ± 0,01	0,54 ± 0,09	1,08 ± 0,09*	1,47 ± 0,18*	0,94 ± 0,18*
Enzimas ligninolíticas					
LP	0,213 ± 0,033	0,087 ± 0,036*	0,084 ± 0,015	0,069 ± 0,012*	0,048 ± 0,003*
MnP	0,101 ± 0,009	0,085 ± 0,012*	0,145 ± 0,045*	0,168 ± 0,075	0,170 ± 0,078
LAC	0,63 ± 0,21	0,27 ± 0,09*	0,30 ± 0,03	0,72 ± 0,03*	0,81 ± 0,18
Glutaciona (ng/mg proteína) ^a					
GSH	328 ± 53	153 ± 8*	520 ± 28*	1430 ± 195*	486 ± 21*
GSSG	66 ± 19	35 ± 4*	73 ± 4*	133 ± 60*	94 ± 9
Enzimas de defesa antioxidante	Atividade (U/mg proteína) ^a				
	<i>M. lucentipes</i>				
	Tempo (dias)	8	10	13	17
CAT	2475 ± 429	2214 ± 150	1689 ± 147*	1548 ± 183	1344 ± 84*
SOD	690 ± 171	426 ± 66*	399 ± 63	576 ± 72*	510 ± 132
GPx	1,72 ± 0,16	1,25 ± 0,20*	0,56 ± 0,08*	0,63 ± 0,09	1,21 ± 0,09*
GR	0,21 ± 0,01	0,39 ± 0,04*	0,36 ± 0,03	0,41 ± 0,03*	0,47 ± 0,03*
GST	0,042 ± 0,006	0,261 ± 0,057*	0,066 ± 0,018*	0,141 ± 0,039*	0,069 ± 0,018*

Tempo (dias)	8	10	13	17	20
Enzimas	Atividade (U/mg proteína) ^a				
ligninolíticas	<i>M. lucentipes</i>				
LP	0,081 ± 0,036	0,060 ± 0,015	0,066 ± 0,015	0,099 ± 0,039*	0,081 ± 0,018
MnP	0,159 ± 0,048	0,069 ± 0,006*	0,048 ± 0,006*	0,039 ± 0,009*	0,031 ± 0,009
LAC	0,24 ± 0,05	0,14 ± 0,03*	0,51 ± 0,09*	0,29 ± 0,06*	0,69 ± 0,04*
	Glutathiona (ng/mg proteína) ^a				
GSH	7464 ± 1338	11174 ± 1892*	12044 ± 2448	8330 ± 1342*	4050 ± 616*
GSSG	46 ± 22	286 ± 124*	223 ± 68	89 ± 34*	71 ± 30

^a n=9. *p <0,05 em relação à idade anterior (10 em relação a 8, 13 em relação a 10, 17 em relação a 13 e 20 em relação a 17).

No micélio da espécie *G. viridilucens*, a atividade de CAT (Figura 12) oscila com o tempo de inoculação. A atividade de SOD (Figura 13) diminui do 8^o para o 10^o dia e a partir daí varia pouco até o 20^o dia. Entre o 8^o e o 10^o dia e entre o 13^o e o 17^o dia, a atividade de SOD diminui, sugerindo que menos H₂O₂ é produzido, diminuindo a atividade de CAT no mesmo período.

Para a espécie *M. lucentipes* a atividade CAT (Figura 14) diminui significativamente com o envelhecimento e a SOD (Figura 14) tem sua atividade significativamente diminuída no 10^o e 13^o dias e, então, volta a aumentar.

Figura 12. Atividade enzimática de CAT no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Figura 13. Atividade enzimática de SOD no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Figura 14. Atividade enzimática de CAT (A) e SOD (B) no micélio do fungo *M. lucentipes* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

As atividades de CAT e SOD variam, respectivamente, entre 680-1600 U/mg proteína e 370-640 U/mg proteína para *G. viridilucens* e 1300-2500 U/mg proteína e 600-800 U/mg proteína para *M. lucentipes*. Estes valores são altos quando comparados com fungos ascomicetos patógenos de plantas (CAT 3-180 U/mg proteína e SOD 5-70 U/mg proteína) (Ayar-Kayali *et al.*, 2002; Ayar-Kayali e Tarhan, 2004; Angelova *et al.*, 2005) e com a bactéria *Escherichia coli* (CAT 40-90 U/mg proteína e SOD 100-120 U/mg proteína) (Perez *et al.*, 2007). No entanto, estas atividades enzimáticas são similares quando comparadas com as de outras espécies de fungos basidiomicetos de podridão branca (degradadores de lignina) não bioluminescentes (CAT 500-2500 U/mg proteína e SOD 200-5000 U/mg proteína) (Kwon e Anderson, 2001; Belinky *et al.*, 2006; Jaszek *et al.*, 2006).

Na espécie *G. viridilucens*, a GPx apresenta perfil inverso ao da bioluminescência e viabilidade celular entre o 10^o e o 17^o dia (Figura 15). Sua atividade aumenta entre o 13^o dia e 17^o dia, enquanto que a bioluminescência e viabilidade celular começam a diminuir. O envelhecimento da cultura pode ser o responsável por maiores quantidades de peróxidos que são eliminados pela GPx.

Figura 15. Atividade enzimática de GPx no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n =9).

A GR, responsável pela redução da GSH também tem o máximo de atividade por volta do 17^o dia (Figura 16), quando a necessidade de regenerar GSH é maior pela alta atividade GPx. Esse resultado é consistente com os níveis encontrados de GSH (Figura 16) e GSSG (Figura 17), pois quando a atividade GR aumenta, o nível de GSH é maior, assim como quando a atividade GPx é maior, aumenta o nível de GSSG. Perfil similar apresenta a GST (Figura 17), que consome GSH. Sua atividade é maior quando os níveis de GSH são maiores. A atividade GST dobra a partir do 13^o dia, justamente quando o fungo parece debilitado, a julgar pela diminuição na viabilidade celular e bioluminescência.

Figura 16. Atividade enzimática de GR (A) e níveis de GSH (B) no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Figura 17. Níveis de GSSG (A) e atividade enzimática de GST (B) no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Como esperado, os níveis de GSH são maiores que os níveis de GSSG, a razão GSH/GSSG varia entre 4 e 11. O aumento de GSH quando a cultura está debilitada pela idade pode representar uma tentativa do organismo de vencer o estresse oxidativo e aumentar seu tempo de vida, ou ainda, redução da atividade das enzimas antioxidantes, como relatado para a maioria dos organismos aeróbios na Teoria do Envelhecimento de Harman. Segundo Harman, as EROs, produzidas normalmente pelos organismos, são as responsáveis por reações com constituintes das células que iniciam mudanças bioquímicas associadas ao envelhecimento (Harman, 1956; Harman, 2006).

As atividades enzimáticas antioxidantes em *G. viridilucens*, com exceção da SOD (Tabela 4), são pelo menos duas vezes maior no micélio que nos corpos de frutificação (Tabela 3). Shimomura também observou maior atividade enzimática no micélio (Shimomura, 1992). Este resultado era esperado uma vez que o micélio é o responsável pela degradação da lignina, processo que produz EROs como radicais hidroxila, peroxila e hidroperoxila (Hammel *et al.*, 2002), tornando necessária maior atividade de defesas antioxidantes no micélio que nos corpos de frutificação, que tem função reprodutora, produzindo esporos.

Em relação às enzimas de degradação ligninolítica, as atividades LAC (Figura 18) e MnP (Figura 19) são maiores quando a cultura envelhece, já a LP (Figura 20) apresenta perfil inverso, diminuindo a atividade com o tempo.

Figura 18. Atividade enzimática de LAC no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Estas enzimas atuam de maneira sinérgica e suas atividades variam entre diferentes espécies de fungos, assim como algumas espécies apresentam apenas duas delas (LP-LAC ou MnP-LAC) (Arora *et al.*, 2002). No caso da espécie *G. viridilucens*, a LP e LAC parecem ser mais importantes na degradação de lignina em culturas jovens e, com o envelhecimento, a atividade de LP cai e as atividades de

MnP e LAC aumentam. As atividades encontradas foram baixas, provavelmente por se tratar de enzimas extracelulares e pelos fungos terem sido cultivados em meio artificial de melaço/levedura, onde não há a necessidade de degradação de lignina.

Figura 19. Atividade enzimática de MnP no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Figura 20. Atividade enzimática de LP no micélio do fungo *G. viridilucens* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Na espécie *M. lucentipes*, a atividade de GPx (Figura 21) diminui até o 13º dia, o que é consistente com a diminuição dos níveis de GSH (Figura 21), que aumentam

até o 13^o dia. A partir do 17^o dia, a atividade GPx começa a aumentar, talvez como resposta antioxidante de defesa, e os níveis de GSH caem.

A atividade GR (Figura 22) aumenta do 8^o ao 10^o dia e volta a aumentar a partir do 13^o dia. Observa-se, neste mesmo período, significativa diminuição nos níveis de GSSG (Figura 22). Apesar deste aumento da atividade GR, os níveis de GSH (Figura 21) não aumentam, ao contrário, diminuem a partir do 13^o dia, possivelmente devido ao aumento da atividade GPx. Os níveis de GSH aumentam até o 13^o dia já que a atividade GPx diminui, consumindo menor quantidade deste redutor biológico.

Figura 21. Atividade enzimática de GPx (A) e níveis de GSH (B) no micélio do fungo *M. lucentipes* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

22. Atividade enzimática de GR (A) e níveis de GSSG (B) no micélio do fungo *M. lucentipes* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

As enzimas GST, LAC e LP não apresentam um perfil compreensível, com valores oscilando positiva e negativamente ao longo do tempo (Figura 23). Já atividade MnP (Figura 24), assim como a CAT, diminui à medida que a cultura envelhece.

Figura 23. Atividade enzimática de GST (A), LAC (B) e LP (C) no micélio do fungo *M. lucentipes* com tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Figura 24. Atividade enzimática de MnP no micélio do fungo *M. lucentipes* com o tempo de inoculação de 8 a 20 dias (n = 9).

Comparando-se as atividades enzimáticas do micélio e dos corpos de frutificação da espécie *M. lucentipes*, observa-se que as atividades GPx, GR, MnP e LAC são praticamente as mesmas. CAT, SOD, GST, LP, GSH e GSSG (10^o ao 13^o dia) apresentam atividade mais baixa nos corpos de frutificação. Ao contrário da espécie *G. viridilucens*, em *M. lucentipes* o nível máximo de GSH coincide com menor atividade GPx. É interessante notar que, à semelhança de organismos superiores, os níveis de peroxidases (CAT, GPx e MnP, no caso), na espécie *M. lucentipes*, diminuem com o crescimento, debilitando o organismo e o levando inexoravelmente ao envelhecimento e morte, atribuídos a peroxidações causadoras de oxidação de resíduos de aminoácidos e agregações proteicos, bem como mutações degenerativas devido ao não reparo de lesões em DNA e morte.

É importante salientar que as enzimas ligninolíticas (LAC, MnP e LP) são produzidas e excretadas para o meio extracelular das hifas, com o intuito de degradar a lignina (Morozova *et al.*, 2007). Desta forma, é de se esperar que as atividades destas enzimas sejam baixas no micélio e nos corpos de frutificação.

4.5 ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR METAIS

Devido à dificuldade de estabelecer um perfil reprodutível de bioluminescência e um tempo de intensidade máxima e constante de luz para a espécie *M. lucentipes*, optou-se por realizar os ensaios de estresse químico apenas com a espécie *G. viridilucens*.

O teste de viabilidade de celular (Figura 25) mostra que os íons Cd^{2+} e Cu^{2+} provocam danos ao fungo, sendo que o dano celular do cobre é mais acentuado que o provocado pelo cádmio, muito provavelmente devido à atividade redox do cobre associada à geração de EROs que danificam a estrutura celular. Assim, a diminuição da bioluminescência após exposição aos metais deve realmente espelhar um sinal de dano celular.

Figura 25. Viabilidade celular de *G. viridilucens* após exposição de 24 h a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9).

As atividades enzimáticas antioxidantes e do metabolismo mitocondrial, bem como os níveis de glutatona reduzida e oxidada no micélio da espécie *G. viridilucens* são apresentados na Tabela 5, onde o asterisco representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Tabela 5. Parâmetros enzimáticos antioxidantes e do metabolismo e níveis de glutatona em micélio de *G. viridilucens* tratado com Cd²⁺ (3,0 mM) e Cu²⁺ (8,1 mM).

	Controle	Cádmio	Cobre
<i>Atividade enzimática antioxidante^{a,b}</i>			
CAT	1503 ± 129	1422 ± 72	1752 ± 153*
SOD	267 ± 123	477 ± 54*	237 ± 33
GPx	0,375 ± 0,021	0,465 ± 0,021*	0,661 ± 0,030*
GR	0,174 ± 0,009	0,306 ± 0,015*	0,117 ± 0,009*
GST	0,312 ± 0,015	0,360 ± 0,018*	0,366 ± 0,012*
<i>Níveis de glutatona^{a,c}</i>			
GSH	810 ± 207	4749 ± 66*	996 ± 240
GSSG	177 ± 33	450 ± 78*	417 ± 189*
<i>Enzimas do metabolismo aeróbio^{a,b}</i>			
CS	0,381 ± 0,053	0,447 ± 0,057*	0,424 ± 0,073
COX	0,081 ± 0,012	0,064 ± 0,009*	0,081 ± 0,020
G6PD	0,504 ± 0,068	0,512 ± 0,036	0,532 ± 0,101

^a n = 9, ^b Umg⁻¹ de proteína, ^c ng/mg de proteína, * p < 0,05.

Um pequeno aumento na atividade de CAT, em torno de 15%, ocorre no fungo quando tratado com cobre. Com cádmio, não houve mudança estatisticamente significativa em relação ao controle (Figura 26). A análise dos resultados permite concluir que o dano causado pelos metais não leva a uma acentuada produção de H₂O₂ e, conseqüentemente, a atividade de CAT mantém-se quase constante. Como a bioluminescência diminui em todos os casos (Figura 26), deduz-se que a CAT e a concentração de H₂O₂ pouco ou nada interferem no processo de emissão de luz. Embora se esperasse que a bioluminescência fosse inibida em torno de 50%,

utilizando-se os valores de concentração de EC_{50} , determinados por Mendes (Mendes e Stevani, 2010), os metais estudados apresentaram bioluminescência diferente da esperada. Tais resultados poderiam ser explicados devido aos valores de EC_{50} estarem em uma região de grande inflexão da curva sigmoidal de toxicidade. De qualquer forma, os valores absolutos observados não interferem na discussão dos resultados.

Figura 26. Atividade enzimática de CAT (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

No caso da SOD, observou-se aumento da sua atividade na presença de cádmio. Com o cobre não ocorreu mudança significativa na atividade de SOD, apesar da inibição da bioluminescência (Figura 27). O aumento na atividade SOD e diminuição da bioluminescência na presença de cádmio pode indicar associação do metal ao tiol de proteínas, cuja forma tiolato oxida-se com aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ e, consequente, indução da biossíntese de SOD.

Figura 27. Atividade enzimática de SOD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

De forma similar ao observado em trabalhos com ratos (Koizumi e Li, 1992) e algas (Pinto *et al.*, 2003), também ocorreu um aumento na atividade GPx do fungo *G. viridilucens* na presença dos metais testados. Percebe-se que, para ambos os metais, o aumento da atividade enzimática é acompanhado de diminuição da bioluminescência (Figura 28). A maior atividade de GPx permite inferir que houve aumento da formação de peróxidos (H_2O_2 e peróxidos orgânicos), induzida pelos metais. Deve-se ressaltar que a GPx atua principalmente quando peróxidos orgânicos são formados ou quando os níveis de H_2O_2 não são extremamente elevados, pois neste caso a CAT seria a responsável pela decomposição (Halliwell e Gutteridge, 2007). Nas medidas de GR (Figura 29), na presença de cádmio, a atividade desta enzima aumentou cerca de 75%, mostrando que mais GSH foi produzida, provavelmente para diminuir a concentração do metal livre, através da quelação com o grupo tiólico. Assim como no trabalho de Braha e colaboradores, com o fungo *Heliscus lugdunensis* (Braha *et al.*, 2007) também ocorreu diminuição

na atividade GR após tratamento com cobre, provavelmente pela quelação do cobre pelos grupos –SH presentes no sítio ativo da enzima (Nagalakshmi e Prasad, 2001).

Figura 28. Atividade enzimática de GPx (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 29. Atividade enzimática de GR (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Parece haver tendência para aumento da atividade de GST, apesar da inibição da luz provocada pela exposição aos metais (Figura 30). Tal fato não

surpreende, pois a GST deve ser mais importante para eliminação de compostos orgânicos tóxicos, especialmente os aromáticos e pouco polares. A enzima é responsável pela catálise do ataque nucleofílico da GSH ao composto orgânico, tornando-o mais hidrofílico e favorecendo a excreção do aduto (Habig *et al.*, 1974).

Figura 30. Atividade enzimática de GST (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Os níveis de GSH (Figura 31) aumentam bastante na presença de cádmio. Este resultado já era esperado, uma vez que a GSH, fitoquelatinas e metalotioneínas, são as principais moléculas envolvidas na desintoxicação de cádmio por organismos eucariontes. No micélio tratado com cobre, o nível de GSH manteve-se praticamente o mesmo em relação ao controle.

Estes resultados ressaltam a importância da GSH como meio de defesa do organismo à presença de cádmio. Soma-se a isso o fato de que as atividades de GPx e, principalmente GR, também aumentam na presença deste metal. O cobre não afeta de maneira significativa os níveis de GSH, embora neste caso, observe-se grande aumento nos níveis de GSSG (Figura 31). Isto pode estar relacionado à

atividade redox do cobre levando à maior oxidação de GSH às custas do consumo de espécies reativas de oxigênio formadas na presença de cobre como, por exemplo, radicais hidroxila via reação de Haber-Weiss. Dos metais testados, o cobre foi o que causou maior aumento nos níveis de GPx, enzima que degrada peróxidos e forma GSSG.

Figura 31. Níveis de glutathiona (cinza): GSH (A) e GSSG (B) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

A necessidade de NADH ou NADPH para ocorrência da reação de bioluminescência (Esquema 10), como comprovado pelo grupo (Oliveira e Stevani, 2009), pode ser o elo metabólico entre os processos de emissão de luz, respiração celular e defesas antioxidantes. O NADH, produzido no Ciclo de Krebs, é utilizado na cadeia de transporte de elétrons para geração de ATP, com consequente redução do oxigênio a água e pode ser transidrogenado a NADPH no espaço mitocondrial intermembranar. O NADPH, coenzima da GR para produção de GSH a partir da GSSG, é mobilizado em condições de estresse oxidativo. Maior quantidade de GSH é requerida e, portanto, maior quantidade de NADPH é necessária para a redução enzimática de GSSG a GSH. Sendo assim, NADPH deve ser disputado pela GR e pela redutase catalisadora da bioluminescência. A reciclagem da glutatona (de GSSG para GSH) é dependente da manutenção de certa quantidade intracelular de NADPH, produzido principalmente através da via das pentoses fosfato. A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD) catalisam passos da via das pentoses fosfato, produzindo NADPH, que é crucial para a proteção das células contra o estresse oxidativo (Esquema 25) (Jamieson, 1998).

Esquema 25. Via das pentoses fosfato.

Na falta de NADPH para produção de GSH, o organismo poderia disponibilizar NADH para sua geração, em uma reação catalisada pela enzima nicotinamida nucleotídeo transidrogenase [NAD(P)⁺ transidrogenase] (Esquema 26) (Nelson e Cox, 2000):

Esquema 26. Conversão de NADH em NAPH catalisada pela NAD(P)⁺ transidrogenase.

Obviamente, a demanda celular de NADH para produção de ATP e de NADPH deve limitar a disponibilidade de NADH para a bioluminescência. Quando um estresse químico é provocado, espera-se que o fungo tenha como funções prioritárias a respiração e a proteção do organismo contra estresse oxidativo. No caso dos metais testados, o sistema de defesa envolvendo GSH, GPx e GR parece ser a principal via de desintoxicação, não só eliminando as EROs geradas, mas

também quelando e inativando metais. Desta forma, supõe-se que a emissão de luz só aconteça quando o fungo se encontre em condições de equilíbrio metabólico, sendo inibida quando o organismo é submetido a estresse oxidativo provocado por metais.

Apesar de não se saber ainda qual é a estrutura da luciferina fúngica, pode-se supor que, caso ela desempenhe um papel antioxidante, como a luciferina de vaga-lumes (Barros e Bechara, 1998; 2000; 2001), a interrupção da via de produção de luz, levaria a um aumento na concentração da luciferina intracelular e, consequentemente, maior efeito antioxidante. É claro que esta hipótese carece de comprovações experimentais, as quais poderão ser realizadas quando a estrutura da luciferina fúngica for conhecida.

A enzima CS tem a atividade significativamente aumentada na presença de cádmio (Figura 32), indicando pequeno aumento na atividade do Ciclo do Ácido Cítrico e, consequentemente, na produção de NADH. No fungo tratado com cobre a atividade não varia significativamente. A atividade da COX foi pouco afetada por cobre e diminuída significativamente por cádmio (Figura 32), indicando inibição da cadeia de transporte de elétrons e, consequentemente, menor produção de ATP. Ao que parece, o efeito do cobre nesta enzima é pequeno, apesar de provocar inibição da bioluminescência. Provavelmente as defesas antioxidantes puderam conter o dano provocado pelo metal, não afetando de forma considerável a respiração celular.

Figura 32. Atividade enzimática (cinza) de CS (A) e COX (B) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Além disso, embora tóxico em concentrações elevadas, o cobre é um metal essencial. O fato de as atividades de COX e SOD terem sido pouco alteradas após tratamento com cobre pode ser devido à função estrutural do cobre nestas enzimas, não sendo a concentração utilizada suficiente para causar danos consideráveis às células.

O dano provocado por cobre parece estar mais ligado à produção direta de radicais, confirmada pelo aumento na atividade peroxidásica total, incluindo GPx. Os

resultados obtidos para o cádmio podem ser interpretados da seguinte forma: a diminuição da atividade da COX pode indicar interferência do metal na cadeia de transporte de elétrons, diminuindo a quantidade de oxigênio totalmente reduzido a água. Isso poderia aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo o radical superóxido, gerado na ubiquinona pela redução incompleta do oxigênio a água, concordando com o aumento da atividade SOD observado no fungo tratado com cádmio. Esse possível aumento nas espécies reativas de oxigênio também explicaria o aumento na atividade de GPx, uma vez que, a maior atividade da SOD leva à maior formação de peróxido de hidrogênio.

Em ratos, observou-se aumento na atividade de CS e inibição da COX após injeção de cádmio (Rao, 1983). Em raízes e folhas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) (Lopez-Millan *et al.*, 2009) o cádmio também provoca aumento na atividade de CS. No fungo ascomiceto *Aspergillus niger* observou-se diminuição na atividade da CS na presença de cádmio e cobre (Tsekova *et al.*, 2000). Segundo Rao (Rao, 1983), o aumento na atividade de CS pode ser devido a mecanismos de controle fisiológico associados com o baixo nível na produção de ATP após administração do metal. Deve-se ressaltar, entretanto, que os trabalhos citados tratam de organismos diferentes, submetidos à estresse por metais em concentrações e tempos de exposição variados.

A atividade da G6PD (Figura 33) praticamente não varia no fungo tratado com ambos os metais. Este resultado reforça a ideia da competição entre as defesas antioxidantes e a bioluminescência pelo NADPH, uma vez que o suprimento de NADPH, produzido por esta enzima, não aumenta na presença destes metais.

Estes resultados sugerem que no caso do cobre, o dano celular causado é devido à ação redox do metal e as enzimas de defesas foram suficientes para conter

o dano, não levando a alterações significativas na CS, COX e G6PD. A inibição da bioluminescência, neste caso, apenas refletiria uma possível competição com as enzimas antioxidantes pelo NAD(P)H, conforme hipótese levantada anteriormente. Em relação ao cádmio, observa-se inibição na COX, indicando que algum dano ocorreu.

Figura 33. Atividade enzimática de G6PD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a cádmio (3,0 mM) e cobre (8,1 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.6 ESTRESSE QUÍMICO PROVOCADO POR FENÓIS

A diminuição da viabilidade celular provocada por fenol e 2,4,6-triclorofenol é praticamente a mesma (Figura 34), indicando que estes fenóis, assim como os metais testados, provocam dano celular ao fungo, o que também é observado pela inibição da bioluminescência. É sabido que fenóis são desacopladores da cadeia respiratória (Weinbach e Garbus, 1964; Escher *et al.*, 1996) e como tal aceleram a velocidade de consumo de oxigênio e induzem hipertermia, assim comprometendo o metabolismo aeróbio, podendo levar o organismo à morte. Em baixas concentrações,

causam um pequeno estresse pré-condicionador, diminuindo a concentração de radicais livres produzidos pelas mitocôndrias e, conseqüentemente, aumentam a vida média de alguns organismos, tal como camundongos (Caldeira Da Silva *et al.*, 2008). A concentração de 2,4,6-triclorofenol utilizada no fungo bioluminescente foi baseada no EC₅₀ de inibição da bioluminescência. Como a diminuição nas EROs se dá apenas em baixas concentrações, não era esperado observar este efeito no nosso caso. Para clorofenóis com 2 a 5 átomos de cloro a concentração aproximada para completo desacoplamento varia entre 0,02 mM e 0,2 mM (Weinbach e Garbus, 1964), sendo menor do que a utilizada nos fungos, que é de 0,78 mM.

Figura 34. Viabilidade celular em *G. viridilucens* após exposição de 24 h a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n = 9).

As atividades enzimáticas antioxidantes e do metabolismo mitocondrial e os níveis de glutathiona no micélio da espécie *G. viridilucens*, tratado com fenol e 2,4,6-triclorofenol, são apresentados na Tabela 6, onde o asterisco representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

As atividades CAT e SOD (Figura 35) não variam significativamente sob tratamento do fungo com fenóis, sugerindo que as espécies H₂O₂ e O₂^{•-} não são as principais responsáveis por danos causados por estes fenóis. A interpretação destes resultados é dificultada pela escassez de dados de literatura sobre defesas

antioxidantes de fungos. Pesquisas de fungos associados a fenóis tratam, basicamente, da degradação destes compostos através da biorremediação. No peixe matrixã (*Brycon amazonicus*) fenol não alterou a atividade de SOD (Avilez *et al.*, 2008) e, no peixe *Carassius auratus*, o 2,4,6-triclorofenol provocou diminuição na atividade desta enzima (Li *et al.*, 2007). Em eritrócitos humanos (Bukowska e Kowalska, 2004) o fenol não provoca mudanças na atividade SOD porque, segundo os autores, esta é uma enzima muito estável e apenas alguns compostos podem inibi-la. O excesso de H_2O_2 inibe a SOD, por isso é importante o papel auxiliar de CAT para eliminar o H_2O_2 produzido pela reação da SOD (Fridovich, 1995).

Tabela 6. Parâmetros enzimáticos antioxidantes e do metabolismo e níveis de glutathione em micélio de *G. viridilucens* tratado com fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM).

	Controle	Cádmio	Cobre
<i>Atividade enzimática antioxidante^{a,b}</i>			
CAT	1315 ± 118	1269 ± 166	1384 ± 137
SOD	68 ± 11	64 ± 13	67 ± 9
GPx	0,144 ± 0,009	0,141 ± 0,027	0,229 ± 0,035*
GR	0,152 ± 0,017	0,184 ± 0,029*	0,162 ± 0,012
GST	0,059 ± 0,016	0,094 ± 0,014*	0,078 ± 0,014*
<i>Níveis de glutathione^{a,c}</i>			
GSH	4372 ± 1401	1464 ± 311*	7850 ± 997*
GSSG	1157 ± 132	538 ± 164*	1901 ± 212*
<i>Enzimas do metabolismo aeróbio^{a,b}</i>			
CS	0,352 ± 0,045	0,350 ± 0,037	0,317 ± 0,015*
COX	0,083 ± 0,012	0,052 ± 0,005*	0,075 ± 0,017
G6PD	0,504 ± 0,068	0,457 ± 0,067	0,424 ± 0,042*

^a n = 9, ^b Umg⁻¹ de proteína, ^c ng/mg de proteína, * p < 0,05.

Figura 35. Atividade enzimática de CAT e SOD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Quando o micélio foi exposto ao fenol, a atividade GPx não variou (Figura 36) assim como a CAT, demonstrando que a formação de espécies peroxídicas não é relevante neste caso. Já o 2,4,6-triclorofenol causou aumento na atividade desta enzima indicando aumento de peróxidos. A atividade de GR (Figura 36) aumenta na presença de fenol e não varia significativamente na presença de 2,4,6-triclorofenol, sugerindo que este último não interfere de maneira significativa nesta enzima, assim como ocorre em eritrócitos humanos (Bukowska e Kowalska, 2004).

Figura 36. Atividade enzimática (cinza) de GPx (A) e GR (B) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n =9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Houve significativo aumento na atividade da GST do micélio do fungo (Figura 37) após exposição aos fenóis. Este resultado já era esperado pela função da GST que é de eliminar compostos orgânicos xenobióticos. Em eritrócitos humanos (Bukowska e Kowalska, 2004) não foi observado aumento na atividade da GST na presença de fenol e, em altas concentrações, houve significante diminuição da atividade. Segundo os autores, concentrações muito altas de fenol provocam uma perturbação na estrutura protéica da enzima, o que causaria a diminuição da

atividade GST (Bukowska e Kowalska, 2004). O efeito do fenol na atividade GST parece variar com a sua concentração. Ao contrário dos eritrócitos, na gramínea *reed canary* (Urbanek *et al.*, 2005), assim como no fungo *G. viridilucens*, foi observado aumento na atividade GST induzido por fenol.

Figura 37. Atividade enzimática de GST (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

O efeito destes fenóis nos níveis de glutathiona é oposto. No micélio tratado com o fenol os níveis de GSH e GSSG (Figura 38) diminuem, ao contrário do efeito do 2,4,6-triclorofenol, que causou aumento tanto na forma oxidada como na reduzida.

Figura 38. Níveis de glutatona (cinza): GSH (A) e GSSG (B) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Estes resultados confirmam que os mecanismos de defesa antioxidante podem variar de um organismo para outro, com a dose de agente tóxico e número, periodicidade e tempo de exposição, crônica ou aguda. No nosso caso, a escolha da concentração dos fenóis baseou-se na inibição da bioluminescência. Parece que a ação da GST é bastante importante, eliminando os fenóis antes de provocarem maiores danos ao organismo. Pode-se observar também que os efeitos provocados pelo fenol e pelo 2,4,6-triclorofenol são diferentes. Para ambos os fenóis, o fato de a

atividade CAT e SOD não variar sugere que as espécies H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$ não são as principais responsáveis pelos danos causados por ele. Para o fenol, o aumento na atividade GR evidencia maior produção de GSH, mas os níveis deste tripeptídeo caem, talvez pelo fato de a GSH ser utilizada como nucleófilo da GST, ao invés de substrato da GPx, que praticamente não variou. A diminuição dos níveis de GSSG pode estar associado ao aumento na atividade GR, que catalisa a redução de GSSG, uma vez que a atividade GPx não varia em relação ao controle. Com o 2,4,6-triclorofenol, o aumento na GPx deve refletir maior formação de peróxidos no meio. Como a atividade GR não variou, a GSH utilizada pela GPx não deve ser totalmente regenerada, levando ao aumento observado de GSSG. Como os níveis de GSH aumentam, talvez isto ocorra pelo aumento de síntese de GSH e não pela redução da GSSG.

A atividade CS (Figura 39) não varia significativamente na presença de fenol e diminui na presença de 2,4,6-triclorofenol, sugerindo pequeno efeito sobre o Ciclo do Ácido Cítrico e, conseqüentemente, na produção de NADH. Já para a COX, o 2,4,6-triclorofenol não provocou variação significativa em relação ao controle enquanto que o fenol provocou diminuição da atividade (Figura 39), indicando inibição da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, menor produção de ATP. Ao que parece, o efeito do 2,4,6-triclorofenol nesta enzima é pequeno, apesar de provocar inibição da bioluminescência. Provavelmente as defesas antioxidantes puderam conter o dano provocado, não afetando de forma considerável a respiração celular. A atividade da G6PD (Figura 40) não varia significativamente no fungo tratado com fenol e diminui na presença de 2,4,6-triclorofenol. Isto confirmaria a hipótese de competição entre as defesas antioxidantes e a bioluminescência pelo NAD(P)H, uma vez que a atividade de

G6PD não aumenta, sugerindo que o fluxo de NADPH formado também não aumenta, sendo necessário desviá-lo da bioluminescência para a proteção do fungo, especialmente no caso do 2,4,6-triclorofenol onde ocorre diminuição na atividade desta enzima.

Figura 39. Atividade enzimática (cinza) de CS (A) e COX (B) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 40. Atividade enzimática de G6PD (cinza) e bioluminescência (verde) no micélio de *G. viridilucens*, após 24 h de exposição a fenol (5,10 mM) e 2,4,6-triclorofenol (0,78 mM) (n = 9). * $p < 0,05$ em relação ao controle.

5 CONCLUSÕES

Diferentes espécies de fungos bioluminescentes podem apresentar características diferentes quanto à emissão de luz e defesas antioxidantes. A própria bioluminescência nos corpos de frutificação varia entre a espécie *G. viridilucens* (emissão apenas no píleo) e *M. lucentipes* (emissão apenas no estipe). A diferença na emissão de luz entre diferentes espécies não se resume aos corpos de frutificação. A intensidade e perfil de luz também podem variar no micélio. Isto pode ser constatado na irregularidade de um perfil de luz reprodutível para a espécie *M. lucentipes*, ao contrário do observado para *G. viridilucens*. Esta mesma irregularidade pode ter levado à dificuldade de se encontrar uma condição de cultura de emissão de luz ótima para *M. lucentipes*.

A viabilidade celular em ambas as espécies varia com o tempo, diminuindo à medida que a cultura envelhece. Para a espécie *G. viridilucens*, o perfil de viabilidade celular com o tempo é similar ao da bioluminescência.

Os ensaios enzimáticos sugerem maior atividade no micélio dos fungos do que nos corpos de frutificação, provavelmente pela função essencialmente reprodutora do corpo de frutificação, sendo a atividade metabólica do fungo concentrada no micélio. Assim como a bioluminescência, o perfil das enzimas de defesa antioxidante e níveis de glutathione variam entre as espécies estudadas. As enzimas ligninolíticas das diferentes espécies também apresentam diferentes perfis, com baixa atividade nas amostras estudadas, provavelmente por serem enzimas de degradação extracelulares e ausência de lignina nos meios de cultura.

O fato de o micélio ter sua viabilidade celular reduzida na presença dos metais e fenóis testados reforça a ideia de que a inibição da bioluminescência,

nestas condições, deve ser sinal de algum dano celular. Os metais parecem provocar um efeito maior nas defesas antioxidantes que os fenóis. Estes últimos parecem ser em boa parte eliminados pela GST, causando poucos efeitos nas demais defesas antioxidantes. O que é interessante nestes resultados é a correlação que se pode fazer entre a inibição da bioluminescência e as defesas antioxidantes. Ao que parece, no caso dos metais, o sistema de defesa envolvendo a glutathione é bastante importante, tanto para eliminar peróxidos, produzidos na presença de cobre, como atuando como quelantes na presença de cádmio. O aumento na atividade da enzima GR, sugere maior consumo de NADPH, cuja produção não foi aumentada, pois a enzima G6PD não teve variação da sua atividade. Desta forma, pode-se defender a hipótese de competição do NAD(P)H pelas defesas antioxidantes/metabolismo celular e a bioluminescência. É concebível que o organismo dê prioridade à manutenção da vida, enquanto a bioluminescência não seria tão vital ao fungo. Estes resultados constituem mais uma evidência de que o mecanismo de bioluminescência proposto é de fato enzimático, e não químico como proposto inicialmente por Shimomura (Shimomura, 1992) e dependente de NAD(P)H.

Concluindo, quando o organismo está sob condições metabólicas normais, a bioluminescência, as defesas antioxidantes e a respiração celular atuam de forma equilibrada e o NAD(P)H é mobilizado por todos estes processos. Quando o fungo é submetido ao estresse químico, o fluxo de NAD(P)H é desviado da bioluminescência, quase exclusivamente para alimentar as defesas antioxidantes e a respiração celular (Figura 41), essenciais para a proteção, manutenção e reprodução do organismo. Sendo assim, qual o papel da bioluminescência do ponto de vista bioquímico? Seria a bioluminescência um processo vital para os fungos? Seria um resquício evolutivo com o propósito puramente biológico de atrair insetos disseminadores de esporos

(Sivinsky, 1981)? Se assim for, o que dizer dos fungos que só emitem luz no micélio e não nos corpos de frutificação? Outra hipótese poderia ser que o sistema luciferina/luciferase do fungo desempenhasse papel antioxidante, como no caso de pirilampos (Barros e Bechara, 1998). Se assim fosse, a interrupção da via bioluminescente poderia levar ao acúmulo da luciferina, conferindo proteção adicional à célula, já que houve indução paralela de síntese de luciferina e de luciferase em condições de hiperóxia. No entanto, esta hipótese carece de confirmação, pois para isso é necessário conhecer a estrutura da luciferina, o que está em andamento em nosso grupo.

Figura 41. A: Consumo (amarelo e verde) e produção (azul) de NADH e NADPH no fungo *G. viridilucens* em condições normais. B :Consumo (amarelo) e produção (azul) de NADH e NADPH em fungo sob estresse químico.

6 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. Oxygen Radicals Biol. Syst., p. 121-6, 1984.
- AIRTH, R. L.; FOERSTER, G. E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, n., p. 567-573, 1962.
- ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.
- ANDER, P. The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CbO as related to lignin and cellulose degradation - a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 297-311, 1994.
- ANGELOVA, M. B.; PASHOVA, S. B.; SPASOVA, B. K.; VASSILEV, S. V.; SLOKOSKA, L. S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycological Research**, v. 109, n. 2, p. 150-158, 2005.
- ARORA, D. S.; CHANDER, M.; GILL, P. K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, n. 2, p. 115-120, 2002.
- AVILEZ, I. M.; HORI, T. S. F.; DE ALMEIDA, L. C.; HACKBARTH, A.; BASTOS NETO, J. D. C.; BASTOS, V. L. F. D. C.; MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148C, n. 2, p. 136-142, 2008.
- AYAR-KAYALI, H.; OZER, N.; TARHAN, L. Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 400, n. 2, p. 265-272, 2002.
- AYAR-KAYALI, H.; TARHAN, L. The effect of cultural conditions on the variations of SOD, CAT and GSH-Px activities and LPO levels in the filamentous fungus *Fusarium equiseti*. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 213-222, 2004.
- AZEVEDO, M.-M.; CARVALHO, A.; PASCOAL, C.; RODRIGUES, F.; CASSIO, F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. **Science of the Total Environment**, v. 377, n. 2-3, p. 233-243, 2007.
- AZZI, A. Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 2, p. 230-232, 2007.

BARROS, M. P.; BECHARA, E. J. H. Bioluminescence as a possible auxiliary oxygen detoxifying mechanism in elaterid larvae. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 5, p. 767-777, 1998.

BARROS, M. P.; BECHARA, E. J. H. Luciferase and urate may act as antioxidant defenses in larval *Pyrearinus termitilluminans* (Elateridae: Coleoptera) during natural development and upon 20-hydroxyecdysone treatment. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 5, p. 648-654, 2000.

BARROS, M. P.; BECHARA, E. J. H. Daily variations of antioxidant enzyme and luciferase activities in the luminescent click-beetle *Pyrearinus termitilluminans*: cooperation against oxygen toxicity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 4/5, p. 393-400, 2001.

BELINKY, P. A.; FLIKSHTEIN, N.; DOSORETZ, C. G. Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 222-228, 2006.

BELOZERSKAYA, T. A.; GESSLER, N. N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 506-515, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-54, 1976.

BRAHA, B.; TINTEMANN, H.; KRAUSS, G.; EHRMAN, J.; BAERLOCHER, F.; KRAUSS, G.-J. Stress response in two strains of the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* after exposure to cadmium and copper ions. **BioMetals**, v. 20, n. 1, p. 93-105, 2007.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**, v. 152, n. 1, p. 73-84, 2004.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, n., p. 79-110, 1989.

CALDEIRA DA SILVA, C. C.; CERQUEIRA, F. M.; BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; KOWALTOWSKI, A. J. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. **Aging Cell**, v. 7, n. 4, p. 552-560, 2008.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 14, p. 5475-80, 1975.

CHEFETZ, B.; CHEN, Y.; HADAR, Y. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3175-3179, 1998.

COLEPICOLO, P.; CAMARERO, V. C. C. P.; ECKSTEIN, J.; HASTINGS, J. W. Induction of bacterial luciferase by pure oxygen. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 4, p. 831-6, 1992.

- COURBOT, M.; DIEZ, L.; RUOTOLO, R.; CHALOT, M.; LEROY, P. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7413-7417, 2004.
- CRAIG, P. M.; WOOD, C. M.; MCCLELLAND, G. B. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **American Journal of Physiology**, v. 293, n. 5, Pt. 2, p. R1882-R1892, 2007.
- DEDEYAN, B.; KLONOWSKA, A.; TAGGER, S.; TRON, T.; IACAZIO, G.; GIL, G.; LE PETIT, J. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 925-929, 2000.
- DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504-511, 2011.
- ESCHER, B. I.; SNOZZI, M.; SCHWARZENBACH, R. P. Uptake, speciation, and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 10, p. 3071-3079, 1996.
- FARISS, M. W. Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. **Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 63-77, 1991.
- FIELD, J. A.; DE JONG, E.; COSTA, G. F.; DE BONT, J. A. M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2219-26, 1992.
- FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, n., p. 114-21, 1984.
- FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology**, v. 105, n., p. 93-104, 1984.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n., p. 97-112, 1995.
- FUJIOKA, K.; CASIDA, J. E. Glutathione S-Transferase Conjugation of Organophosphorus Pesticides Yields S-Phospho-, S-Aryl-, and S-Alkylglutathione Derivatives. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 8, p. 1211-1217, 2007.
- GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, v. 124, n. 1, p. 25-60, 1993.
- GADD, G. M. **Fungi in Bioremediation**. 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.
- GIANNI, P.; JAN KACZOR, J.; DOUGLAS MAHONEY, J.; STUART PHILLIPS, M.; TARNOPOLSKY MARK, A. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. **Experimental gerontology**, v. 39, n. 9, p. 1391-400, 2004.

GREDILLA, R.; GRIEF, J.; OSIEWACZ, H. D. Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospira anserina*. **Experimental gerontology**, v. 41, n. 4, p. 439-447, 2006.

GUILLEN, F.; GOMEZ-TORIBIO, V.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. Production of Hydroxyl Radical by the Synergistic Action of Fungal Laccase and Aryl Alcohol Oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 383, n. 1, p. 142-147, 2000.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th. ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HAMMEL, K. E.; KAPICH, A. N.; JENSEN, K. A.; RYAN, Z. C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 445-453, 2002.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

HARMAN, D. Free radical theory of aging: an update increasing the functional life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, n. Understanding and Modulating Aging, p. 10-21, 2006.

JAECKEL, P.; KRAUSS, G.-J.; KRAUSS, G. Cadmium and zinc response of the fungi *Heliscus lugdunensis* and *Verticillium cf. alboatrum* isolated from highly polluted water. **Science of the Total Environment**, v. 346, n. 1-3, p. 274-279, 2005.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 16, p. 1511-1527, 1998.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; GRAZ, M.; BRAHA, B.; MENGE, S.; SCHLOSSER, D.; KRAUSS, G.-J. Species-specific Cd-stress Response in the White Rot Basidiomycetes *Abortiporus biennis* and *Cerrena unicolor*. **BioMetals**, v. 19, n. 1, p. 39-49, 2006.

JASZEK, M.; GRZYWNOWICZ, K.; MALARCZYK, E.; LEONOWICZ, A. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 3, p. 147-154, 2006.

KELLEY, R. L.; REDDY, C. A. Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 248-53, 1986.

KERSTEN, P. J. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 8, p. 2936-40, 1990.

KOIZUMI, T.; LI, Z. G. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 37, n. 1, p. 25-36, 1992.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E. K.; CHANDRASEKAR, P. H. A comparative study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 914-920, 2005.

KUMARI, H. L.; SIRSI, M. Purification and properties of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Archiv fuer Mikrobiologie**, v. 84, n. 4, p. 350-7, 1972.

KWON, S.-I.; ANDERSON, A. J. Catalase activities of *Phanerochaete chrysosporium* are not coordinately produced with ligninolytic metabolism: Catalases from a white-rot fungus. **Current Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 8-11, 2001.

LEONTIEVSKY, A. A.; MYASOEDOVA, N. M.; BASKUNOV, B. P.; EVANS, C. S.; GOLOVLEVA, L. A. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. **Biodegradation**, v. 11, n. 5, p. 331-40, 2000.

LEONTIEVSKY, A. A.; MYASOEDOVA, N. M.; GOLOVLEVA, L. A.; SEDARATI, M.; EVANS, C. S. Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentrations of chlorophenols. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 599-604, 2002.

LEVITZ, S. M.; DIAMOND, R. D. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. **The Journal of infectious diseases**, v. 152, n. 5, p. 938-45, 1985.

LI, F.; JI, L.; LUO, Y.; OH, K. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver as affected by 2,4,6-trichlorophenol. **Chemosphere**, v. 67, n. 1, p. 13-19, 2007.

LOPEZ-MILLAN, A.-F.; SAGARDOY, R.; SOLANAS, M.; ABADIA, A.; ABADIA, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2-3, p. 376-385, 2009.

MENDES, L. F.; BASTOS, E. L.; DESJARDIN, D. E.; STEVANI, C. V. Influence of culture conditions on mycelial growth and bioluminescence of *Gerronema viridilucens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 1, p. 132-139, 2008.

MENDES, L. F.; STEVANI, C. V. Evaluation of metal toxicity by a modified method based on the fungus *Gerronema viridilucens* bioluminescence in agar medium. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 320-326, 2010.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; GONCALVES, R. L. S.; COSTA, E. M.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; OLIVEIRA, M. F.; DE CASTRO, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 644-653, 2009.

MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Phenols- sources and toxicity. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 3, p. 347-362, 2007.

MILNE, L.; NICOTERA, P.; ORRENIUS, S.; BURKITT, M. J. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 304, n. 1, p. 102-9, 1991.

MIWA, S.; ST-PIERRE, J.; PARTRIDGE, L.; BRAND, M. D. Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 8, p. 938-948, 2003.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; GORBACHEVA, M. A.; SHLEEV, S. V.; YAROLOPOV, A. I. "Blue" laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.

MUHEIM, A.; LEISOLA, M. S. A.; SCHOEMAKER, H. E. Aryl-alcohol oxidase and lignin peroxidase from the white-rot fungus Bjerkandera adusta. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2-3, p. 159-67, 1990.

MURPHY, M. P.; HOLMGREN, A.; LARSSON, N.-G.; HALLIWELL, B.; CHANG, C. J.; KALYANARAMAN, B.; RHEE, S. G.; THORNALLEY, P. J.; PARTRIDGE, L.; GEMS, D.; NYSTROEM, T.; BELOUSOV, V.; SCHUMACKER, P. T.; WINTERBOURN, C. C. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361-366, 2011.

NAGALAKSHMI, N.; PRASAD, M. N. V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in Scenedesmus bijugatus. **Plant Science (Shannon, Ireland)**, v. 160, n. 2, p. 291-299, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2000.

OHSUMI, Y.; KITAMOTO, K.; ANRAKU, Y. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 6, p. 2676-82, 1988.

OKAMOTO, O. K.; ASANO, C. S.; AIDAR, E.; COLEPICOLO, P. Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga Tetraselmis gracilis (Prasinophyceae). **Journal of Phycology**, v. 32, n. 1, p. 74-79, 1996.

OKAMOTO, O. K.; ROBERTSON, D. L.; FAGAN, T. F.; HASTINGS, J. W.; COLEPICOLO, P. Different regulatory mechanisms modulate the expression of a dinoflagellate iron-superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19989-19993, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; STEVANI, C. V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 10, p. 1416-1421, 2009.

PALMA, C.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. Enhanced catalytic properties of MnP by exogenous addition of manganese and hydrogen peroxide. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 3, p. 263-267, 1997.

PAPINUTTI, L.; MARTINEZ, M. J. Production and characterization of laccase and manganese peroxidase from the ligninolytic fungus Fomes sclerodermeus. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 6, p. 1064-1070, 2006.

- PEREZ, J. M.; CALDERON, I. L.; ARENAS, F. A.; FUENTES, D. E.; PRADENAS, G. A.; FUENTES, E. L.; SANDOVAL, J. M.; CASTRO, M. E.; ELIAS, A. O.; VASQUEZ, C. C. Bacterial toxicity of potassium tellurite: unveiling an ancient enigma. **PLoS One**, v. 2, n. 2, p. No pp given, 2007.
- PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITAO, M. A. S.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICOLA, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 6, p. 1008-1018, 2003.
- RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASIL'CHENKO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology (Translation of Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya)**, v. 40, n. 1, p. 1-17, 2004.
- RAJOTTE, J. W.; COUTURE, P. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 59, n. 8, p. 1296-1304, 2002.
- RAO, P. V. V. P. Effects of intraperitoneal cadmium administration on mitochondrial enzymes in rat tissues. **Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 81-7, 1983.
- REES, J.-F.; DE WERGIFOSSE, B.; NOISET, O.; DUBUISSON, M.; JANSSENS, B.; THOMPSON, E. M. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defense mechanisms into deep-sea communication tools. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1211-1221, 1998.
- SHIMOMURA, O. The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, n. 256, p. 1519-25, 1992.
- SINGH, S.; MELO, J. S.; EAPEN, S.; D'SOUZA, S. F. Potential of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) for phytoremediation of phenol. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 71, n. 3, p. 671-676, 2008.
- SIVINSKY, J. Arthropods attracted to luminous fungi. **Psyche**, v. 88, n. 3-4, p. 383-390, 1981.
- SRERE, P. A.; BRAZIL, H.; GONEN, L. Citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 17, n. Suppl. 1, p. S129-S134, 1963.
- STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321-36, 1995.
- TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique hydrogen peroxide-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 8, p. 2280-4, 1984.
- TSEKOVA, K.; DENTCHEV, D.; TODOROVA, D. Effect of cadmium and copper on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica (Prague)**, v. 45, n. 4, p. 331-334, 2000.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 1, p. 3-8, 1997.

URBANEK, H.; MAJOROWICZ, H.; ZALEWSKI, M.; SANIEWSKI, M. Induction of Glutathione S-Transferase and Glutathione by Toxic Compounds and Elicitors in Reed Canary Grass. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 13, p. 911-914, 2005.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688-95, 1992.

WEINBACH, E. C.; GARBUS, J. The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 240, n. 4, p. 1811-1819, 1964.

WEITZ, H. J.; BALLARD, A. L.; CAMPBELL, C. D.; KILLHAM, K. The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 2, p. 165-170, 2001.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 5, p. 549-561, 2008.

ZLATEVA, T.; DI MURO, P.; SALVATO, B.; BELTRAMINI, M. The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. **FEBS Letters**, v. 384, n. 3, p. 251-254, 1996.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Olivia Domingues Bazito

Local e data de nascimento: São Paulo, 07 de dezembro de 1980.

FORMAÇÃO

Ensino Médio - Escola Estadual Major Telmo Coelho Filho, Osasco-SP, 1998.

Graduada em Química - Centro Universitário FIEO, Osasco-SP, 2003 (Bacharelado).

Graduada em Química - Centro Universitário FIEO, Osasco-SP, 2003 (Licenciatura).

Doutorado em Química - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2012.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

IV Meeting of SFRBM - South American Group - Free Radical School, Santiago, Chile, 2009.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

2002-2003 - Iniciação Científica

Orientador: Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani, Centro Universitário FIEO

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Projeto: Cogumelos bioluminescentes: cultivo e caracterização da luciferina fúngica

2006-2012 - Doutorado Direto

Orientador: Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani, Departamento de Química Fundamental, IQ-USP

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Projeto: Bioluminescência e metabolismo aeróbio de fungos sob estresse físico e químico

PUBLICAÇÕES

Resumos em Congressos

- Bioluminescência e atividade enzimática do fungo *Gerronema viridilucens* na presença de Cd^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} . 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Fortaleza-CE).
- Bioluminescência e atividade enzimática do fungo *Gerronema viridilucens* na presença de Cd^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} . I Encontro de Pós-Graduação do Instituto de Química - USP.
- Bioluminescence and antioxidant defenses of *Gerronema viridilucens* by Cd^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} ions. Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009 (Santiago, Chile).
- Glutathione as a link among fungal bioluminescence, antioxidant defenses and respiration. 16th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (Lion, França).
- Relação entre bioluminescência, defesas antioxidantes e respiração celular em fungo bioluminescente exposto a cádmio e cobre. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (Florianópolis-SC).