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

RODRIGO PIMENTA CARVALHO

**Purificação, caracterização e estudo mecanístico
com luciferina fúngica**

Versão corrigida da tese
de doutorado defendida em 29/07/2016

São Paulo
Data do depósito na CPG:
20/06/2016

RODRIGO PIMENTA CARVALHO

**Purificação, caracterização e estudo mecanístico
com luciferina fúngica**

*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

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Carvalho, Rodrigo Pimenta
C331p Purificação, caracterização e estudo mecanístico com luciferina
fúngica / Rodrigo Pimenta Carvalho. -- São Paulo, 2016.
136p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Stevani, Cassius Vinicius

1. Produtos naturais 2. Bioluminescência I. T. II. Stevani,
Cassius Vinicius, orientador.

547.7 CDD

Agradecimentos

Gostaria de agradecer inicialmente a minha namorada Ana Paula, minha família e aos meus amigos por todo apoio, paciência e incentivo ao longo desses anos. Agradeço também meu orientador, Cassius Vinicius Stevani, por me dar a oportunidade de trabalhar em algo tão fascinante e desafiador, permitindo que eu tivesse uma enorme vivência e aprendizagem em diversas áreas da ciência, que certamente serão de extrema importância para o meu desenvolvimento profissional.

Também gostaria de agradecer ao Prof. Ernani Pinto e seu grupo de pesquisa, especialmente o Dr. Felipe Dörr, por permitir que eu fizesse uma parte essencial do meu projeto utilizando os equipamentos do seu laboratório, assim como a imensurável contribuição científica e experimental para o desenvolvimento do mesmo. Gostaria de agradecer também aos grupos de pesquisa do Prof. Josef Wilhelm Baader e do Prof. Erick Bastos, por sempre estarem dispostos a me ajudar na realização de diversos experimentos ao longo do meu doutorado, ao Prof. Paolo Di Mascio, por sua disponibilidade e o fornecimento de reagentes para a realização dos experimentos de marcação isotópica, e ao Prof. Ilia Yampolsky, por sua contribuição científica e pelo fornecimento de reagentes essenciais para o andamento do projeto.

Por fim, gostaria de agradecer especialmente a Fapesp pelo auxílio financeiro, a Universidade de São Paulo e a todos os colegas de laboratório e funcionários do Instituto de Química.

Resumo

Carvalho, R. P. **“Purificação, caracterização e estudo mecanístico com luciferina fúngica”** 2016. (136p.) Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este tese descreve métodos para a purificação e determinação da massa molecular do precursor da luciferina fúngica, a partir dos corpos de frutificação do fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri*. A molécula em questão é o substrato da primeira etapa da reação enzimática responsável pela emissão de luz em fungos, fenômeno conhecido como bioluminescência. Ao longo do projeto, foi otimizado um ensaio analítico qualitativo para detecção do precursor da luciferina em solução, e também foram desenvolvidos métodos de extração e purificação da molécula de interesse, levando sempre em consideração a baixa quantidade da molécula disponível *in vivo* e a susceptibilidade de degradação da molécula quando exposta a oxigênio, luz e pH extremos. Após estabelecer diversas condições cromatográficas para a purificação do precursor da luciferina, foi possível correlacionar uma molécula de massa molecular 246,05 u com uma atividade positiva no ensaio analítico qualitativo para detecção da luciferina em solução. Posteriormente, foi descoberto por um grupo russo que o precursor da luciferina tinha massa molecular 246,05 u e fórmula molecular $C_{13}H_{10}O_5$. Também foram realizados experimentos a fim de corroborar a estrutura molecular do produto da reação de emissão de luz em fungos, assim como determinar o seu mecanismo de formação.

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

Abstract

Carvalho, R. P. “**Purification, carachterization and mechanistic study with the fungal luciferin**” 2016. (136p.) PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This thesis describes methods for purification and determination of molecular mass of fungal luciferin precursor from fruiting bodies of bioluminescent fungus *Neonothopanus gardneri*. The molecule it is the substrate of enzymatic reaction first step responsible for light emission in fungi, phenomenon known as bioluminescence. During PhD, it was optimized a qualitative assay in order to detect the luciferin precursor in solutions and also were developed methods for extraction and purification of the molecule of interest, always considering the low amount of molecule available *in vivo* and the susceptibility of molecule degradation when exposed to oxygen, light and extremes pH's. After establishing several chromatographic conditions for purification of luciferin precursor, it was possible to correlate a molecule with molecular mass of 246.05 u with a positive activity in the qualitative analytical assay. Later, a Russian group describe that the precursor of luciferin had molecular mass 246.05 u and molecular formula $C_{13}H_{10}O_5$. Experiments were also performed in order to corroborate the molecular structure of the reaction product of light emission in fungi as well as determine its formation mechanism.

Keywords: fungal, bioluminescence, hispidin, luciferin.

Lista de abreviações

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio molecular singlete;

$^3\text{O}_2$ – Oxigênio molecular triplete;

ATP – *adenosine triphosphate*;

AVS – *anthracene-9-10-divinylsulfonate*;

BME – *2-mercaptoethanol*;

BSA – *Bovine serum albumin*;

DDM – *n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside*;

DTT – *dithiothreitol*;

EPEL – Ensaio padrão de emissão de luz;

FRET – *Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer*;

GFP – *Green fluorescent protein*;

HPLC – *High-performance liquid chromatography*;

HPLC/MS – *High-performance liquid chromatography linked with mass spectrometry*;

NADH – *nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)*;

NADPH – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)*;

NAP(P)H – *nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)* ou *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)*.

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Bioluminescência geral	13
1.2. Bioluminescência em fungos.....	22
1.3. Mecanismo de emissão de luz em fungos bioluminescentes	24
2. Objetivos	34
3. Procedimento experimental	34
3.1. Meios de cultura	34
3.2. Preparação do extrato frio (fonte de hidroxilase/luciferase)	35
3.3. Preparação do extrato quente (fonte do precursor da luciferina fúngica)	36
3.3.1. Extração acelerada por solvente	36
3.3.1.1. Extração utilizando solução de 2-mercaptoetanol	36
3.3.1.2. Extração utilizando solução de ditioneína	36
3.3.2. Extração no tubo potter	37
3.4. Extração quimicamente ativa	38
3.4.1. Utilizando acetato de etila	38
3.4.2. Utilizando acetato de etila/etanol	38
3.5. Concentração do extrato quente	39
3.6. Ensaio padrão de emissão de luz (EPEL)	39
3.7. Purificação do precursor da luciferina fúngica	40
3.7.1. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	40
3.7.1.1. Utilizando uma coluna Luna C₁₈ (2)	40
3.7.1.2. Utilizando uma coluna Synergi Polar-RP	40
3.7.1.2.1. Modo gradiente.....	40
3.7.1.2.2. Modo isocrático	41
3.7.2. Separação por cromatografia em coluna	41
3.7.3. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas de alta resolução (HPLC/MS)	42
3.7.3.1. Utilizando uma coluna Luna C₁₈ (2)	43
3.7.3.1.1. Modo isocrático	43
3.7.3.1.2. Modo gradiente.....	43

3.7.3.2. Utilizando uma coluna Synergi Polar-RP	43
3.7.3.3. Utilizando uma coluna Synergi Max-RP	44
3.7.3.4. Utilizando uma coluna Acclaim [®] Mixed Mode HILIC-1	44
3.7.4. Separação por extração em fase sólida (SPE).....	44
3.7.4.1. Utilizando um cartucho Sep-Pak [®] Vac.....	45
3.8. Fracionamento da hispidina e da 3-hidróxi-hispidina.....	46
3.9. Análises de fluorescência por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	47
3.10. Ensaio quimiluminescente padrão	47
3.11. Estudo da cinética da reação luciferina/luciferase	48
3.12. Espectro de fluorescência.....	48
3.13. Espectrofotometria UV-vis	49
3.14. Estudo do mecanismo da reação luciferina/luciferase	49
3.14.1. Injeções dos padrões de reação	49
3.14.2. Injeções do meio reacional do ensaio quimiluminescente padrão	50
3.14.2.1. Injeção direta	50
3.14.2.2. Concentração por filtros moleculares	51
3.14.2.3. Concentração via SPE-online.....	51
3.14.3. Estudo do consumo de luciferina e formação da possível oxiluciferina na reação luciferina/luciferase	53
3.14.4. Estudo do consumo de luciferina e formação da possível oxiluciferina em tampão fosfato	54
3.14.5. Marcação isotópica da possível oxiluciferina com ¹⁸ O ₂	54
4. Resultados e discussão	57
4.1. Explorações iniciais.....	57
4.2. Ensaio padrão de emissão de luz (EPEL)	58
4.3. Extração acelerada por solvente	60
4.4. Extração quimicamente ativa	64
4.5. Purificação do precursor da luciferina fúngica	65
4.6. Elucidação da estrutura molecular do precursor da luciferina e da luciferina fúngica.....	92
4.7. Estudos com a hispidina	92

4.8. Espectros de fluorescência e determinação do rendimento quântico de fluorescência da possível oxiluciferina.....	96
4.9. Estudo cinético da reação luciferina/luciferase	97
4.10. Determinação do rendimento quântico de quimiluminescência e rendimento quântico singlete da reação luciferina/luciferase	101
4.11. Estudo do mecanismo da reação luciferina/luciferase.....	105
5. Conclusão	130
6. Referências	131

1. Introdução

1.1. Bioluminescência geral

Bioluminescência pode ser definida como a emissão de luz fria e visível por organismos vivos. Este fenômeno desperta a curiosidade da humanidade desde os tempos de Aristóteles (384 – 322 a.C.) e Plínio (23 – 79 d.C.) (Harvey 1957). Utilizando uma bomba de ar construída artesanalmente, Robert Boyle (1627 – 1691) demonstrou que a luminescência observada em carne apodrecida (bactérias) e fungos dependia de ar. Benjamim Franklin (1706 – 1790) acreditava que a bioluminescência observada nos oceanos era proveniente de um fenômeno de natureza elétrica, porém mudou sua opinião quando descobriu que tal emissão podia ser filtrada com um pano. Paolo Panceri (1833 – 1929) ficou conhecido por suas publicações sobre a anatomia e a histologia de diversos tipos de organismos bioluminescentes, enquanto que Raphael Dübois foi o primeiro pesquisador a utilizar os termos luciferina e luciferase para descrever os componentes das reações de emissão de luz em organismos vivos (Shimomura 2006). Eilhardt Wiedemann (Wiedemann 1888) cunhou o termo “luminescência” para se referir a emissão de luz fria e visível, e posteriormente, Harvey (Harvey 1916) utilizou o termo “bioluminescência” para mencionar a luminescência observada em organismos vivos pela primeira vez.

A bioluminescência sempre acontece de forma controlada pois requer gasto de energia química. Na maioria dos casos está sob o controle do sistema nervoso, seja primitivo, como o dos insetos, celenterados e hidrozóários, ou mais desenvolvido, como o de crustáceos, moluscos e peixes. A emissão de luz também pode ser observada através do estresse mecânico, no caso de bactérias, sob influência da luz solar com ritmo circadiano, no caso de fungos,

ou por ambos meios, no caso de dinoflagelados (Shimomura 2006, Oliveira *et al.* 2015).

Quanto à distribuição, pode ser encontrada em uma grande diversidade de organismos, desde bactérias e protistas até organismos considerados mais complexos, como lulas e peixes. Uma conhecida peculiaridade sobre a bioluminescência está relacionada ao fato de que a maioria dos organismos bioluminescentes descritos serem encontradas no oceano, contrastando com o menor número de organismos terrícolas e de água-doce descritos na literatura. Na verdade, o grupo de organismos bioluminescentes não-marinhos pode ser rapidamente descrito: bactérias terrícolas, vagalumes, algumas espécies de vermes e minhocas, centopéias, os moluscos *Latia neritoides* e *Quantula striata*, as moscas *Arachnocampa flava* e *Orfelia fultoni* e uma centena de espécies de fungos. É importante mencionar que não existe nenhuma regra simples ou razão aparente para a maior distribuição da bioluminescência no meio marinho (Harvey 1940; Shimomura 2006).

Considera-se que o estudo moderno de bioluminescência começou em 1885, quando Dubois demonstrou o primeiro exemplo de reação luciferina/luciferase *in vitro* (Dubois 1887). Neste experimento, ele preparou dois extratos a partir dos órgãos luminosos do besouro *Pyrophorus noctilucus*. Um dos extratos foi preparado triturando os órgãos luminosos do besouro em água gelada (extrato frio), que resultou em uma suspensão luminosa, cuja luminescência decresceu gradualmente e por fim desapareceu. O outro extrato foi preparado de maneira análoga a descrita anteriormente, porém em água quente (extrato quente). O extrato quente teve sua luminescência suprimida imediatamente, sendo o mesmo resfriado logo em seguida. Quando ambos os

extratos foram combinados, Dubois observou que a emissão de luz era restabelecida. Posteriormente, Dubois observou o mesmo comportamento para os extratos feitos a partir do molusco bivalve *Pholas dactylus* (Dubois 1887). Assim, ele concluiu que o extrato frio era composto por uma fração proteica, termo-lábil, necessária para a emissão de luz, que ele denominou de luciferase. No extrato quente, onde as proteínas haviam sido desnaturadas devido à alta temperatura, haveria uma substância relativamente termo-estável, também necessária para a emissão de luz, que ele nomeou de luciferina. Deste modo, uma reação luciferina/luciferase pode ser vista como uma reação substrato/enzima que resulta em emissão de luz.

Inicialmente, o termo luciferina se referia a uma molécula termo-estável presente no extrato quente, preparado a partir de órgãos luminosos de organismos bioluminescentes. Harvey sugeriu que a luciferina e a luciferase poderiam ser diferentes para diferentes tipos de gêneros, após descobrir que a luciferina do molusco bivalve *Pholas dactylus* era diferente da luciferina do ostracóide *Cypridina hilgendorffii* (Harvey 1920). Esta visão generalizada continuou durante a década de 1950, quando foi descoberto que as luciferinas do ostracóide *C. hilgendorffii*, de vagalumes e de bactérias eram quimicamente diferentes entre si. Porém, em 1960, foi demonstrado que as luciferinas dos peixes bioluminescentes *Parapriacanthus* e *Apogon* eram idênticas à luciferina do ostracóide *C. hilgendorffii*. Posteriormente, foi descoberto que a celenterazina era a luciferina de uma diversa gama de organismos bioluminescentes, como algumas espécies de celenterados, camarões, lulas e peixes (Shimomura 2006). Baseado nisso, pode-se definir luciferina como um termo genérico para denominar uma molécula orgânica, cuja oxidação é responsável pela emissão

de luz observada presente em organismos vivos. É interessante ressaltar que apesar de haver maior diversidade de organismos bioluminescentes nos oceanos, muitos sistemas são dependentes de celenterazina, biossintetizada ou absorvidas pela alimentação. A diversidade dos sistemas terrícolas é muito maior.

O mecanismo de uma reação bioluminescente pode ser descrito, basicamente, pela reação da luciferina com oxigênio molecular, catalisada por uma luciferase, onde o produto da reação (denominado de oxiluciferina) é formado em um estado eletronicamente excitado, cujo decaimento do estado excitado para o estado fundamental é responsável pela emissão de luz. Em termos moleculares, considera-se que toda reação bioluminescente é uma reação quimiluminescente (Cambell 1988; Shimomura 2006). Na verdade, há uma certa confusão no uso dos dois termos. Quando a reação acontece em um organismo vivo deve-se chamá-la de bioluminescência; quando em um ensaio, seja ele com enzimas ou reagentes químicos não proteicos, quimiluminescência.

Até o presente momento, apenas nove tipos de luciferinas foram identificadas, sendo que desde o início da década de 90, apenas duas novas luciferinas foram caracterizadas (Nakamura *et al.* 1989; Shimomura 2006; Petushkov *et al.* 2014; Purtov *et al.* 2015). Dentre os organismos bioluminescentes que possuem suas luciferinas caracterizadas, estão gastrópodes, ostracoides, celenterados, dinoflagelados, anelídeos, vagalumes, bactérias e fungos (Figura 1). Existem ainda muitos grupos de organismos luminosos descritos na literatura (Shimomura 2006; Hadock *et al.* 2010), dos quais pouco ou quase nada é sabido a respeito da estrutura de suas luciferinas. Estes grupos incluem moluscos bivalves, estrelas-do-mar e ofiuróides,

tunicados, lulas, vermes marinhos (poliquetas), peixes, moscas (díptera) e centopéias (diplópodes). O insucesso na elucidação da estrutura molecular da luciferina nestes sistemas se deve, em grande parte, às dificuldades em se obter material em quantidade e de se estabelecer um ensaio padrão simples e eficiente, do tipo quente/frio de Dubois (Dubois 1887), necessário para auxiliar na detecção da presença da luciferina nas frações que estão sendo purificadas. Além disso, a maior parte das luciferinas isoladas até hoje apresentam grande susceptibilidade a degradação quando expostas a oxigênio, luz e pH extremos. Também se deve considerar a necessidade de grande quantidade de material biológico para a extração e purificação da luciferina, uma vez que a quantidade presente *in vivo* é extremamente baixa.

Figura 1: Estruturas das luciferinas conhecidas até o momento.

Também são conhecidos alguns casos de sistemas bioluminescentes os quais não respondem ao ensaio com extratos quente e frio idealizado por Dubois. Dentre eles, é possível citar o exemplo da água-viva *Aequorea victoria*. A emissão de luz *in vitro* deste sistema somente é observada quando se adiciona Ca^{2+} ao extrato frio. Em 1961, Shimomura e colaboradores purificaram a proteína do extrato frio responsável pela emissão de luz, denominada aequorina (Shimomura *et al.* 1962). Além de ser possível observar a emissão de luz na ausência de oxigênio, os autores descobriram que a luz observada é emitida por uma reação intramolecular que ocorre internamente na proteína, e que a intensidade de emissão de luz total é proporcional à quantidade de aequorina. Posteriormente, foi descoberto que uma proteína semelhante estava envolvida no mecanismo de emissão de luz do anelídeo marinho *Chaetopterus*, sendo que a emissão de luz somente é observada com a adição de Fe^{2+} e peróxidos. Por se tratar de um novo tipo de mecanismo de emissão de luz em organismos bioluminescentes, onde o ensaio de emissão de luz proposto por Dubois não poderia ser aplicado, foi utilizado o termo fotoproteína para designar uma classe de proteínas com propriedades semelhantes à aequorina e à do anelídeo marinho *Chaetopterus* (Shimomura & Johnson 1966). Mais precisamente, pode-se definir fotoproteína como um complexo proteico estável, presente em organismos bioluminescentes, no qual estão associadas uma luciferina e uma proteína (ocasionalmente oxigênio molecular também está associado em alguns organismos), cuja reação de emissão de luz é iniciada na presença de um cofator (Shimomura 1985). Este cofator pode variar de acordo com o organismo bioluminescente, por exemplo, Ca^{2+} para *A. victoria*, peróxido de hidrogênio para poliqueta *Hamothoe lununata* e ATP para o diplópode *Luminodesmus sequoia*.

(Shimomura 2006). A emissão de luz total é proporcional à quantidade de fotoproteína em solução. Essa proporção é a principal diferença entre os sistemas que possuem fotoproteínas quando comparados aos sistemas que respondem aos ensaios com extratos quente/frio, onde a emissão de luz total é proporcional a quantidade de luciferina em solução (Shimomura 1985).

Em relação ao mecanismo de emissão de luz *in vitro* da *A. victoria*, a luciferina é denominada de celenterazina, a proteína (sem a luciferina) é denominada de apoaequorina e o complexo proteico (proteína + luciferina), de aequorina. A emissão de luz (azul) *in vitro* ocorre somente quando Ca^{2+} está presente na solução, pois o cátion se liga à apoaequorina preferencialmente em relação a celenterazina, que está na forma de hidroperóxido no complexo (Shimomura & Johnson 1978; Musicki *et al.* 1986). O rompimento da ligação entre a celenterazina e a apoaequorina faz com que a hidroperóxido-celenterazina reaja intramolecularmente, formando celenteramida em um estado eletronicamente excitado, cujo decaimento para o estado fundamental é responsável pela produção de luz azul observada. Nos ensaios *in vitro*, foi possível regenerar a aequorina através da adição de um quelante e celenterazina sintética no meio (Shimomura & Johnson 1975). O quelante tinha como função retirar o Ca^{2+} dos sítios ligantes da apoaequorina, para que a mesma se ligasse a celenterazina, possibilitando novamente a formação da aequorina (Esquema 1). Vale lembrar que este mecanismo de regeneração foi observado apenas de forma *in vitro*, e que não se sabe ao certo qual é o mecanismo de regeneração *in vivo* da aequorina.

Esquema 1

A *A. victoria* apresenta emissão de luz verde *in vivo*, ao contrário da emissão de luz azul *in vitro*, observada nos experimentos com a aequorina. Posteriormente foi descoberto que esta diferença na cor era devido a presença de uma proteína fluorescente no verde, a *green fluorescent protein* (GFP) na *A. victoria*. Na mesma época em que Shimomura e colaboradores estudavam o mecanismo de emissão de luz da aequorina, eles purificaram a GFP da *A. victoria*, que possui espectro de emissão com λ_{max} na região do verde ($\lambda_{\text{em,max}} = 510 \text{ nm}$) (Shimomura *et al.* 1962; Johnson *et al.* 1962). Nos anos seguintes, Shimomura e colaboradores descobriram que a emissão de luz azul da aequorina ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$) correspondia ao λ_{max} do espectro de excitação da GFP ($\lambda_{\text{exc,max}} = 460 \text{ nm}$) (Shimomura & Johnson 1969; Kohama *et al.* 1971; Cormier *et al.* 1973). Em seguida, foi comprovado que a proteína em questão era a aceptora e a aequorina era a doadora em uma reação de transferência de energia do tipo

Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), ou seja, a emissão de luz do sistema da aequorina fornecia energia para que um cromóforo da proteína fosse excitado eletronicamente, cujo decaimento para o estado fundamental era o responsável pela emissão de luz verde observada na *A. victoria* (Morin & Hastings 1971ab; Morise *et al.* 1974). Este sistema, além de introduzir o conceito de fotoproteína aos estudos de mecanismos bioluminescentes, foi o primeiro sistema a ser descrito o qual envolvia uma emissão de luz de através de uma proteína auxiliar.

Por esses motivos, o estudo de organismos bioluminescentes pode ser considerado fundamental para o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas em diversos campos de pesquisas acadêmicas e aplicadas. O sistema bioluminescente de vagalumes, por exemplo, é usado como um método universal de quantificação de ATP (Campbell 1988) e fotoproteínas sensíveis a Ca^{2+} , como a aequorina de águas-vivas, são largamente utilizadas no monitoramento intracelular de Ca^{2+} , que regula vários processos biológicos importantes (Shimomura 2006). Certos análogos da luciferina do ostracóide *C. hilgendorffii* são empregados como sondas para medidas de ânion superóxido. Proteínas fluorescentes como a GFP, extraídas de águas-vivas, são utilizadas como genes repórteres no campo da pesquisa biomédica (Badr & Tannous 2011). Todas essas aplicações derivadas de estudos químicos da bioluminescência somente existem em virtude do empenho e dedicação de pesquisadores para tentar compreender o fenômeno (Shimomura 2006; Wilson & Hastings 1998).

1.2. Bioluminescência em fungos

Atualmente, são conhecidas aproximadamente 102 espécies de fungos bioluminescentes, pertencentes a quatro linhagens conhecidas (Armillaria, Omphalotus, Micenóide e Lucentipes) (Desjardin *et al.* 2008, 2010; Oliveira *et al.* 2012; Desjardin, comunicação pessoal). Das linhagens conhecidas, 73 espécies de fungos bioluminescentes pertencem à linhagem Micenóide (71%), 16 pertencem a linhagem Omphalotus (16%), 11 pertencem a linhagem Armillaria (11%) e 2 pertencem a linhagem Lucentipes (2%) (Desjardin *et al.* 2008, 2009). As espécies estão distribuídas na América do Norte (28 das 102), Central (7), do Sul (23), Europa (31), África (10), China (9), Ásia (31), Oceania (9) e Japão (38) (Figura 2). Ao todo, 15 de todas as espécies descritas no mundo podem ser encontradas no Brasil.

Figura 2: Distribuição das 102 espécies de fungos bioluminescentes existentes no Brasil e no mundo até 2016.

Todas as espécies de fungos bioluminescentes conhecidas até hoje pertencem ao filo *Basidiomycota* e à ordem *Agaricales*. Os fungos são multicelulares e apresentam uma organização celular formando longos filamentos celulares, conhecidas como hifas. O conjunto de hifas é denominado de micélio (Figura 3). Por serem basidiomicetos, todas as espécies de fungos bioluminescentes necessariamente possuem basidiocarpos, que são mais conhecidos como corpos de frutificação ou cogumelos, que nada mais é do que uma estrutura reprodutora destes fungos, onde se desenvolvem células produtoras de esporos (no caso, basidiósporo) (Raven *et al.* 2007; Tortora *et al.* 2009). Em relação à emissão de luz, todas as espécies de fungos bioluminescentes possuem seu micélio luminescente, enquanto que seus respectivos corpos de frutificação podem emitir luz apenas no píleo, apenas no estipe, ou em ambos (Figura 3, Desjardin *et al.* 2008).

Figura 3: Fotografias mostrando algumas das estruturas de fungos, onde: I – Placa de petri com o micélio do fungo bioluminescente *Neonothopanus Gardneri* cultivado *in vitro*; II – Emissão de luz do micélio do fungo bioluminescente *Neonothopanus Gardneri* cultivado *in vitro*; III - Corpo de frutificação do fungo bioluminescente *Mycena luxeterna*, indicando o píleo e o estipe; IV - Emissão de luz do corpo de frutificação do fungo bioluminescente *Mycena luxeterna*. Fotos: Cassius Vinicius Stevani.

A cor da luz produzida por todas as espécies de fungos bioluminescentes é similar, com seu máximo de emissão em torno de 530 nm, sugerindo o envolvimento de um emissor comum em todos eles (Desjardin *et al.* 2007; Desjardin & Braga-Neto 2007). Fungos bioluminescentes emitem luz de forma contínua e, geralmente, a luminescência é muito mais intensa em corpos de frutificação e micélios jovens, embora a mesma possa variar bastante dependendo da espécie e condições ambientais (Shimomura 2006). Recentemente foi descoberto que a intensidade de emissão de luz de micélios do fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri* segue um ritmo circadiano, cuja intensidade de emissão de luz é menor durante o dia e maior durante a noite (Oliveira *et al.* 2015).

1.3. Mecanismo de emissão de luz em fungos bioluminescentes

No que diz respeito ao mecanismo de fungos bioluminescentes, McElroy foi responsável pela primeira obtenção de luz *in vitro* a partir destes organismos, no fim da década de 1950 (Airth & McElroy 1959), utilizando o ensaio com extratos quente e frio de Dubois. Posteriormente, Airth e Foerster realizaram diversos experimentos com o objetivo de isolar as substâncias responsáveis pela emissão de luz (Airth 1961; Airth & Foerster 1960, 1962, 1965). Duas espécies de fungos bioluminescentes foram examinadas: *Armillaria mellea* e *Collybia velutipes*. Foi observado que o processo de emissão de luz dependia de duas enzimas, uma solúvel e dependente de NAD(P)H, e outra de membrana, com função catalítica sobre a emissão de luz. Os autores também observaram que as enzimas, bem como os substratos, eram os mesmos para os dois fungos utilizados. O procedimento experimental se fundamentava na preparação de um extrato quente com os cogumelos secos a fim de se obter a luciferina fúngica.

Em seguida, um homogenato com o outro cogumelo era preparado a frio e fracionado por ultracentrifugação, com o intuito de separar as enzimas, visto que uma era solúvel e a outra não. A emissão de luz podia ser observada quando o extrato quente, contendo a luciferina, era misturado com o sobrenadante (proveniente da ultracentrifugação) na presença de NAD(P)H, seguida da adição do pellet ressuspensionado (também proveniente da ultracentrifugação), após alguns minutos de incubação. Quanto maior o tempo de incubação ou a quantidade da enzima dependente de NAD(P)H, maior era a intensidade de emissão. Nesta proposta, primeiramente ocorre a reação de redução da luciferina fúngica (Ln), catalisada por enzima dependente de NAD(P)H e, em seguida, ocorre a reação de oxidação da luciferina fúngica reduzida (LnH₂), catalisada por uma enzima de membrana, formando a oxiluciferina (OxiLn) em um estado eletronicamente excitado, e seu decaimento para o estado fundamental é responsável pela emissão de luz (Esquema 2).

Esquema 2

Durante a década de 1960, Kuwabara e Wassink (Kuwabara & Wassink 1966) isolaram 12 mg de um composto, na forma cristalina e de cor marrom, do extrato quente do fungo bioluminescente *Mycena citricolor*, que emitia luz *in vitro* quando era submetida tanto a ensaios enzimáticos (ensaio com extratos quente e frio), quanto a ensaios não-enzimáticos (ou ensaios quimiluminescentes). No ensaio enzimático, preparado de acordo com a metodologia descrita por Airth e Foerster (Airth & Foerster 1962), a reação de emissão de luz ocorria na presença

de NADPH e de um extrato frio (fonte de enzimas). Neste caso, a emissão de luz possuía λ_{max} em 524 nm, em pH 6,5. Já no ensaio não-enzimático, a reação de emissão de luz ocorria na presença de hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio. Neste caso, a emissão de luz possuía λ_{max} em 542 nm. Algumas propriedades físico-químicas dessa substância foram determinadas, tais como: absorção em 320 nm, fluorescência em 490 nm (λ_{exc} 460 nm), e algumas bandas indicando grupos carbonila, obtidas através do espectro de IV (Kuwabara & Wassink 1966). Porém, a estrutura desse composto nunca foi determinada.

Na década de 1970, Endo e colaboradores isolaram 2 novos compostos a partir dos corpos de frutificação do fungo bioluminescente *Pleurotus japonicus*. Um deles, denominado iludina S (Figura 4), apresentava um espectro de absorção similar ao do composto obtido por Kuwabara e Wassink (Endo *et al.* 1970; Kuwabara & Wassink 1966). O outro composto isolado, ergosta-4,6,8(14),22-en-3-ona (Figura 4), possuía um espectro de emissão idêntico (λ_{max} = 530 nm) ao de bioluminescência de diversos fungos (Endo *et al.* 1970).

No fim da década de 1980, também a partir desse mesmo fungo, Isobe e colaboradores isolaram a riboflavina e a lampteroflavina (Figura 4), que possuíam um espectro de emissão (λ_{max} 524 nm) semelhante ao espectro de bioluminescência de fungos (Isobe *et al.* 1987, 1988). Com exceção das semelhanças apresentadas entre os espectros de absorção e de fluorescência destas moléculas (Figura 4) com o observado para a bioluminescência de fungos, nenhum fato adicional comprovou o envolvimento de qualquer uma destas moléculas no mecanismo de emissão de luz de fungos *in vivo*. Além disso, considerando que fungos bioluminescentes podem conter vários compostos fluorescentes e com mesma absorção, e que o espectro de emissão

de algumas delas pode ser similar ao espectro de bioluminescência, uma coincidência espectral não é suficiente para comprovar que o composto isolado é responsável pela emissão de luz na bioluminescência fúngica. Assim, é importante demonstrar que um determinado composto isolado está envolvido na reação de emissão de luz.

Figura 4: Moléculas isoladas do fungo bioluminescente *Pleurotus japonicus*.

Também no fim da década de 1980, foi formulada uma proposta não enzimática para a reação de emissão de luz em fungos. Segundo Nakamura e colaboradores, os extratos preparados a partir do fungo bioluminescente *Panelus stipticus* não emitiam luz quando submetidos ao ensaio com extratos quente e frio, proposto por Dubois (Nakamura *et al.* 1988). Os autores somente observavam a emissão de luz quando adicionavam H_2O_2 e Fe^{2+} aos extratos preparados. Os autores também observavam um aumento na intensidade de emissão de luz quando os extratos eram tratados com sulfato de amônio ou com

aminas primárias, sugerindo assim a presença de um possível precursor da luciferina fúngica nos extratos. Posteriormente, foram isolados 3 tipos de precursores da luciferina fúngica (Figura 5) do fungo *Panelus stipticus*, que apresentavam uma intensa emissão de luz quando submetidos ao ensaio não enzimático (ou ensaio quimiluminescente) supracitado (Shimomura 1989, 1991). Foram encontradas outras substâncias capazes de emitir luz quando submetidas ao ensaio não enzimático em mais cinco espécies de fungos bioluminescentes, porém estas substâncias nunca tiveram as suas estruturas determinadas. Em uma troca de correspondências com Shimomura, Nakamura comunicou que acreditava que estas novas substâncias eram derivadas do ácido caféico (Figura 5), a partir de alguns dados experimentais obtidos (Shimomura 2006). Porém, estes dados nunca foram publicados. Por não ter obtido sucesso em demonstrar a presença de uma proteína atuando como catalisador no processo de emissão de luz, Shimomura sugeriu que a reação de emissão de luz em fungos bioluminescentes não ocorria de forma enzimática, ou seja, ele acreditava que não havia uma luciferase envolvida na reação de emissão de luz em fungos bioluminescentes.

Figura 5: Estrutura molecular dos possíveis precursores da luciferina fúngica e do ácido caféico.

A natureza enzimática da reação de emissão de luz em fungos bioluminescentes foi comprovada somente em 2009, por Oliveira e Stevani (Oliveira & Stevani 2009). Utilizando o ensaio com extratos quente e frio, os autores observaram que a emissão total de luz observada dependia linearmente da quantidade de substrato (extrato quente) e as constantes de velocidade observadas (formação e decaimento) dependiam da concentração de enzima, evidenciando assim que a reação de emissão de luz em fungos bioluminescentes ocorria por uma via enzimática. Os autores também corroboraram o envolvimento de duas enzimas no processo de emissão de luz, uma solúvel e dependente de NAD(P)H, e a outra insolúvel, conforme fora proposto por Airth e Foerster (Airth & McElroy 1959; Airth & Foerster 1962). Foi demonstrado também que o espectro de bioluminescência de um corpo de frutificação do fungo bioluminescente *Gerronema viridilucens* era similar ao espectro de emissão de luz obtido de maneira *in vitro*, através do ensaio com extratos quente e frio (Figura 6), indicando que a reação responsável pela emissão de luz *in vitro* era a mesma que ocorria *in vivo* em fungos bioluminescentes. Posteriormente, também utilizando o ensaio com extratos quente e frio, Oliveira e Stevani demonstraram que os substratos, assim como as enzimas, eram os mesmos para as quatro linhagens de fungos bioluminescentes conhecidas (Oliveira *et al.* 2012). É interessante ressaltar que não foi confirmada a presença de enzimas e substrato em fungos não bioluminescentes, mostrando que estes só deveriam existir em fungos bioluminescentes. Esta hipótese foi formulada através da utilização de um único fungo não bioluminescente, *Filoboletus gracilis*, como controle, uma espécie filogeneticamente próxima às linhagens bioluminescentes.

Figura 6: Comparação entre os espectros de bioluminescência do corpo de frutificação do fungo *G. viridilucens* (—) e a emissão de luz *in vitro* do ensaio com extratos quente e frio (—).

Recentemente, Purto e colaboradores caracterizaram o substrato e o produto da reação catalisada pela enzima solúvel dependente de NAD(P)H (Esquema 2, Purto *et al.* 2015). Foi observado que Ln correspondia a uma molécula conhecida como hispidina, e o produto da reação catalisada pela enzima solúvel dependente de NAD(P)H, LnH₂, era equivalente a 3-hidróxi-hispina (Esquema 3). Deve-se ressaltar que o esquema proposto por Airth e Foerster foi bastante influenciado pelo mecanismo de emissão de luz de bactérias bioluminescentes. Assim, supunha-se que a luciferina era a molécula que reagia inicialmente com a redutase e não com a luciferase, pois ambas enzimas formariam um complexo enzimático.

A hispidina é um metabólito secundário presente em fungos basidiomicetos e algumas plantas (Beckert *et al.* 1997; Lee & Yun 2011). Ela é precursora da luciferina, a 3-hidróxi-hispina. Deste modo, também foi demonstrado que a enzima dependente de NAD(P)H era na verdade uma

hidroxilase e não uma redutase, ao contrário do que fora proposto por Airth e Foerster, (Purtov *et al.* 2015).

Esquema 3

Purtov e colaboradores foram capazes de elucidar a estrutura molecular do precursor da luciferina preparando extratos quentes de espécies de fungos não bioluminescentes. Partindo do princípio de que o mecanismo de emissão de luz era o mesmo para diferentes espécies de fungos, conforme descrito por Oliveira (Oliveira *et al.* 2012), o grupo acreditava que o precursor da luciferina poderia estar presente tanto em fungos bioluminescentes como em fungos não bioluminescentes. Estes provavelmente notaram também que apenas fungos não bioluminescente e filogeneticamente próximos às espécies bioluminescentes, como *F. gracilis*, haviam sido testados segundo a hipótese enzimática. Foram preparados extratos quentes, a partir de corpos de frutificação, de diversas espécies de fungos não bioluminescentes e testados com o extrato frio do fungo bioluminescente *Neonothopanus nambi*, em ensaios de emissão de luz similares aos desenvolvidos por Oliveira e Stevani (Oliveira & Stevani 2009). Foi observada emissão de luz nos ensaios utilizando extratos quentes de cinco espécies diferentes de fungos não bioluminescentes (*Pholiota squarrosa*, *Tricholoma sp.*, *Phenellius sp.*, *Russula foetens* e *Clitocybe sp.*). Além

disso, também foi constatado que esses extratos possuíam uma quantidade cerca de 100 vezes maior do precursor da luciferina, quando comparado a micélios dos fungos bioluminescentes *N. namibi* e *Mycena citricolor*. Trabalhando com uma quantidade muito maior do precursor da luciferina, e utilizando técnicas como HPLC e RMN (^1H , ^{13}C , entre outros), foi possível isolar a molécula e verificar que a estrutura molecular do precursor da luciferina era equivalente a hispidina (Esquema 3). Para corroborar esta hipótese, a hispidina foi isolada de diferentes espécies de fungos bioluminescentes e submetida a ensaios de emissão de luz, onde também foi observada a emissão de luz. Por fim, a hispidina foi adquirida comercialmente e testada frente ao ensaio de emissão de luz onde, além da emissão de luz ser visível a olho nu, o espectro emissão *in vitro* era similar ao espectro de emissão observado *in vivo*. Diante dos fatos citados, o grupo concluiu que a hispidina realmente era a molécula precursora da luciferina.

Para elucidarem a estrutura da luciferina fúngica, Purto e colaboradores separaram e purificaram parcialmente as enzimas envolvidas na reação de emissão de luz em fungos bioluminescentes. Foram realizados ensaios de emissão de luz utilizando apenas a hispidina, NADPH e a enzima solúvel que catalisava a reação. É importante citar que não ocorria emissão de luz nesta etapa da reação. Alíquotas do ensaio eram retiradas e analisadas em um HPLC, permitindo observar a formação do produto da reação, sendo que a maior concentração do produto foi obtida após 35 min de reação. O produto da reação foi isolado e analisado por RMN (^1H , ^{13}C , entre outros) e espectroscopia de massas, onde foi constatado que o mesmo era correspondente a 3-hidróxi-hispina. O produto também foi submetido ao ensaio de emissão de luz somente

com a fração do extrato frio rica em luciferase, onde foi observada a emissão de luz. Deste modo, além de demonstrarem que a estrutura da luciferina fúngica era correspondente a 3-hidróxi-hispina, foi comprovado que ocorria a adição de uma hidroxila a hispidina catalisada por uma hispidina-3-hidroxilase na primeira etapa da reação, e não uma redução catalisada pela redutase como se acreditava até então.

É possível encontrar na literatura estudos descrevendo a hispidina como uma molécula com atividade antioxidante e anticancerígena (Park *et. al.* 2004; Lim *et. al.* 2014), porém em nenhum estudo o mecanismo que envolve tais propriedades é descrito na literatura. Por isso, a determinação do mecanismo de emissão de luz em fungos pode ser um fator que auxilie a compreender e descrever melhor as propriedades da hispidina. Também é de conhecimento que a hispidina e/ou a 3-hidróxi-hispina estão presentes em algumas plantas (Beckert *et. al.* 1997), fato este inédito na história dos estudos de bioluminescência, já que não é conhecida nenhuma luciferina que estivesse presente em outro tipo de organismo não bioluminescente (exceto FMN, em bactérias). O mais interessante sobre este fato é que, a partir da elucidação da luciferina fúngica, é absolutamente plausível o desenvolvimento de plantas bioluminescentes, através da clonagem da hidroxilase e da luciferase em plantas que possuam a hispidina como metabólito secundário, ou através da clonagem da luciferase em plantas que possuam a 3-hidróxi-hispina como metabólito secundário. O desenvolvimento de plantas bioluminescentes contribuirá para o desenvolvimento da biologia molecular como um todo, além de novamente relembrar a importância do estudo de organismos bioluminescentes para propiciar novas perspectivas de estudos acadêmicos e aplicados.

2. Objetivos

Os objetivos iniciais deste projeto eram isolar e determinar a estrutura da luciferina fúngica, a partir de corpos de frutificação (cogumelos) do fungo *Neonothopanus gardneri*, para que, em seguida, fosse possível iniciar os estudos mecanísticos sobre as etapas elementares e de quimiexcitação. Mais especificamente, os objetivos deste projeto eram:

- Extração e isolamento da luciferina no menor número possível de etapas.
- Isolamento do produto da reação de emissão de luz, a oxiluciferina.
- Determinação da estrutura molecular e planejamento da síntese da luciferina e da oxiluciferina.
- Estudo das etapas químicas elementares envolvidas no processo de emissão de luz.

3. Procedimento experimental

3.1. Meios de cultura

O meio de cultura em ágar utilizado consiste em uma mistura contendo 8 g de melaço de cana-de-açúcar para fins alimentícios (grau Brix 82,2%, Pol 55,94%), 0,8 g de extrato de levedura (Oxoid) e 16 g de ágar (Oxoid), em 800 mL de água deionizada. A concentração final dessa mistura é 1,0% (m/v) de melaço, 0,10% (m/v) de extrato de levedura, 2,0% (m/v) de ágar e pH 6,0. Para a esterilização dos meios de cultura, colocou-se a mistura em um frasco Schott de 1 L dentro de uma autoclave vertical Phoenix nas seguintes condições: 30 minutos, 125°C e 1,2 kgf cm⁻² de pressão. Depois de esterilizado, o meio de cultura foi levado ao fluxo laminar, onde as placas foram inoculadas com micélios do fungo *Neonothopanus gardneri*, sobre membranas de diálise (Sigma Aldrich) esterilizadas. As culturas dos fungos cresceram dentro de uma câmara climática

(WT Binder KMF 240) sob o abrigo de luz, 25°C e 80-90% de umidade, onde as culturas do fungo *N. gardneri* permanecem entre 1-2 semanas até posterior uso.

3.2. Preparação do extrato frio (fonte de hidroxilase/luciferase)

O extrato frio foi preparado a partir de micélios frescos do fungo *N. gardneri*, provenientes do cultivo de suas culturas em meio sólido sobre membranas de diálise, conforme descrito no item anterior. As membranas de diálise com o micélio foram retiradas do meio de cultura com o auxílio de uma pinça esterilizada. As membranas foram transferidas para um potter (Elvehjem), e em seguida, foi adicionado tampão fosfato para extração gelado (fosfato (Sigma-Aldrich), 0,1 M, pH 7,5) e um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich). O extrato obtido foi centrifugado a $10.000 \times g$ durante 10 min a 4°C (Eppendorf, modelo 5804 R, rotor F34-6-38). O sobrenadante foi separado em um tubo do tipo *Falcon*® (TRP) e o pellet descartado. Dependendo de sua finalidade, o extrato frio bruto (0,6 mg/mL em média; Teste de Bradford) era ultracentrifugado (Hitachi, modelo RP50T-2, rotor P50AT2-716) a $194.000 \times g$ durante 90 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido pode ser utilizado como fonte de hidroxilase. Já o pellet era ressuspendido com tampão fosfato para extração, para ser utilizado como fonte de luciferase (0,2 mg/mL em média; Teste de Bradford). Caso fosse necessário utilizar tais frações por mais de um dia, as mesmas eram aliquotadas e armazenadas em nitrogênio líquido.

3.3. Preparação do extrato quente (fonte do precursor da luciferina fúngica)

3.3.1. Extração acelerada por solvente

3.3.1.1. Extração utilizando solução de 2-mercaptoetanol

Para a preparação do extrato quente, foram utilizados corpos de frutificação desidratados do fungo *N. gardneri*. Os cogumelos secos foram triturados em um liquidificador (Britânia) até a formação de um pó fino e em seguida foram adicionados 1 g de Celite® (70-230 mesh, 60 Å, Sigma-Aldrich) para cada 1,5 g de cogumelos. Para cada extração, o total desta mistura foi transferido para uma célula de extração (volume de 33 mL), previamente montada com um filtro de fibra de vidro. Então, a célula foi colocada no compartimento de um equipamento de extração acelerada por solvente (ASE 300 Dionex®). Foram realizadas extrações utilizando um solvente composto por uma solução 0,025% H₂O/HCOOH (v/v), pH 3,0 contendo 20 mM de 2-mercaptoetanol (BME, Sigma). A amostra foi extraída a 80°C e sob 1500-1700 psi de pressão, utilizando um tempo de pré-aquecimento de 5 min e extração de 10 min. Todo o processo foi realizado sob atmosfera de nitrogênio e no final do processo o extrato obtido foi armazenado em um frasco com septo mantido sob abrigo de luz e em banho de gelo até seu uso. O volume médio final dos extratos quentes obtidos foi de aproximadamente 40 mL.

3.3.1.2. Extração utilizando solução de ditioneitol

Foram utilizadas soluções de extração 0,025% H₂O/HCOOH (v/v), pH 3,0, contendo ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich) em diversas concentrações (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM). As condições utilizadas no equipamento de extração acelerada por solvente (ASE 300 Dionex®) foram idênticas as descritas

no item anterior. O volume médio final dos extratos quentes obtidos foi de aproximadamente 40 mL.

3.3.2. Extração no tubo potter

Para a preparação do extrato quente, foram utilizados micélios frescos do fungo *N. gardneri* e do fungo *G. viridilucens*, provenientes do cultivo de suas culturas em meio sólido sob uma membrana de diálise, conforme descrito anteriormente no item 3.1. Para a extração, os micélios foram separados cuidadosamente das membranas de diálise com o auxílio de um bisturi. Foram utilizados cerca de 1 g (em média) de micélios do fungo *N. gardneri* e 5 g (em média) do fungo *G. viridilucens*. Então, os mesmos foram congelados com N₂ líquido e triturados até a formação de um pó fino, com o auxílio de um pistilo e almofariz. Os micélios foram colocados em um liofilizador (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System da Labconco) durante 12 horas. A massa final de micélios obtida apresentava uma redução, em média, de aproximadamente 80%. O pó fino formado foi homogeneizado em um tubo *potter* (Elvehjem), com 2 mL de uma solução 0,025% H₂O/HCOOH (v/v), pH 3,0 contendo 5 mM de ditioneitol (DTT, Sigma), previamente aquecida a 80°C. O extrato obtido foi então centrifugado a 12.000 × *g* durante 10 min a 4°C (centrífuga de bancada Eppendorf, 5804 R com rotor F34-6-38). O sobrenadante foi separado em um tubo do tipo *Falcon*® (TRP) e o pellet descartado. O sobrenadante era aplicado em um filtro de corte molecular de 10 kDa (Vivaspin 6, GE Healthcare) e centrifugado a 15.000 × *g* durante 20 min a 4°C.

3.4. Extração quimicamente ativa

3.4.1. Utilizando acetato de etila

O volume de extrato quente obtido através da extração acelerada por solvente teve seu pH ajustado para 3,0 com HCOOH (Merck). Cada uma dessas porções foi extraída 3 vezes com cerca de 15 mL de acetato de etila (Synth) em um funil de separação. Durante o processo de extração com acetato de etila, há a formação de uma emulsão dificultando a visualização da separação das fases orgânica e aquosa. Deste modo, a mistura foi transferida para tubos do tipo *Falcon*[®] (TRP). A mistura toda foi centrifugada a 12.000 x g durante 5 min e 4°C. A fase orgânica foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e imediatamente transferida para um frasco lacrado mantido sob banho de gelo seco/etanol. Já a fase aquosa foi transferida novamente para o funil de extração e todo processo de extração foi repetido mais duas vezes, sendo que todas as fases orgânicas foram combinadas e as fases aquosas, descartadas.

3.4.2. Utilizando acetato de etila/etanol

O volume de extrato quente obtido através do extrator teve seu pH ajustado, quando necessário, para 3,0 com HCOOH (Merck). Em seguida, o extrato quente foi transferido para um frasco Schott de 500 mL, no qual foram adicionados 80 mL (2 x o volume do extrato) de acetato de etila (Synth) e 6 mL (5% do volume total da mistura) de etanol (Sigma). Borbulhou-se argônio na mistura e a mesma foi agitada vigorosamente e transferida para uma proveta de 250 mL. A mistura foi deixada em repouso, durante cerca de 1 min, para que houvesse a separação total das 2 fases. Feito isso, a fase orgânica foi retirada com o auxílio de uma pipeta automática (Eppendorf), e transferida para um

frasco lacrado mantido sob banho de gelo seco/etanol. A fase aquosa foi descartada.

3.5. Concentração do extrato quente

A fase orgânica, obtida através da extração quimicamente ativa, teve seu volume reduzido com auxílio de um rotaevaporador (Büchi R-205), até que todo traço de solvente orgânico não estivesse presente. Em seguida, o extrato obtido foi dissolvido em cerca de 500 μL de uma solução aquosa contendo 0,025% HCOOH (v/v), pH 3,0 e 5 mM de ditioneitol. Essa solução (extrato obtido mais 500 μL 0,025% HCOOH (v/v), pH 3,0 e 5 mM de ditioneitol), denominada de extrato quente concentrado, foi guardada em um frasco com septo sob atmosfera de argônio a -20°C até seu uso.

3.6. Ensaio padrão de emissão de luz (EPEL)

Para detectar a presença do precursor da luciferina fúngica em uma amostra, foi desenvolvido um ensaio padrão no qual é observada, com o auxílio de um luminômetro (Berthold, modelo Sirius FB15), a emissão ou não de luz. O ensaio consiste em misturar 200 μL do extrato frio (fonte de hidroxilase e luciferase), 50 μL de uma solução 1 mg/mL de BSA (albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich), 50 μL da amostra em que se deseja determinar a presença do precursor da luciferina e 50 μL de uma solução 70 mM de NADPH (Sigma-Aldrich), concentração final 1 mM, totalizando um volume final de 350 μL para esse ensaio. Para a realização do branco, 50 μL do tampão fosfato de extração são utilizados, ao invés da amostra que seria utilizada como fonte do precursor de luciferina. A intensidade de luz é registrada durante 1 min (tempo mínimo) ou 3 min (tempo máximo) no luminômetro. Todas as reações foram feitas a 25°C e sob proteção contra luz.

3.7. Purificação do precursor da luciferina fúngica

3.7.1. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os cromatogramas obtidos foram registrados em um equipamento de HPLC da marca Shimadzu LC20AT (equipado com duas bombas 551, arranjo de diodos SPD M-20A e detector de fluorescência RF – 20A). Foram utilizadas diferentes colunas cromatográficas e proporções de fase móvel nos experimentos de purificação da luciferina. Em todos os casos, foram injetadas alíquotas de 100 µL do extrato quente concentrado.

3.7.1.1. Utilizando uma coluna Luna C₁₈ (2)

Foi utilizada uma coluna Luna C₁₈ (2), 250 x 4,6 mm (Phenomenex), com fluxo de 1,0 mL/min, e uma fase móvel composta por água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)), na proporção 27/73 em modo isocrático. As amostras injetadas foram eluídas durante 100 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.1.2. Utilizando uma coluna Synergi Polar-RP

3.7.1.2.1. Modo gradiente

Foi utilizada uma coluna Synergi Polar-RP, 250 x 4,6 mm (Phenomenex), com fluxo de 1,0 mL/min, e uma fase móvel composta por água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)) em um gradiente onde a proporção de metanol variava da seguinte maneira:

- 0% – 20% no intervalo de 0 a 5 minutos;
- 20% – 80% no intervalo de 5 a 15 minutos;
- Constante em 80% de 15 a 25 minutos;
- 80% – 0% de 25 a 26 minutos;

As amostras injetadas foram eluídas durante 30 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.1.2.2. Modo isocrático

Foram injetadas amostras de 100 µL do extrato concentrado no HPLC, utilizando uma coluna Synergi Polar-RP, 250 x 4,6 mm (Phenomenex), com fluxo de 1,0 mL/min, e uma fase móvel composta por água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)), na proporção 27/73 em modo isocrático. As amostras injetadas foram eluídas durante 30 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.2. Separação por cromatografia em coluna

Para esta separação, 1 mL do extrato quente concentrado foi colocado em um tubo de 15 mL do tipo *Falcon*[®] (TRP), e uma extração quimicamente ativa foi realizada, em um procedimento análogo ao descrito no item 3.4.2., porém sem a adição de etanol. Em seguida, TLC foram realizados a fim de verificar em qual tipo de fase móvel iria interagir melhor com o precursor da luciferina fúngica, presente extrato quente concentrado, dissolvido em acetato de etila. A fase estacionária das placas de TLC era composta de sílica gel. Foi utilizada uma fase móvel composta por acetato de etila e hexano, em 3 diferentes proporções (v/v):

- 80% de hexano e 20% de acetato de etila.
- 50% de hexano e 50% de acetato de etila.
- 20% de hexano e 80% de acetato de etila.

O TLC foi relevado, primeiramente, com o auxílio de uma lâmpada UV-vis, e em seguida, com ácido fosfomolibdico (Sigma). Após escolher a fase móvel mais adequada para o experimento (20% de hexano e 80% de acetato de etila),

a coluna cromatográfica foi preparada. Primeiramente, foi inserido um pequeno pedaço de algodão próximo a torneira da coluna de vidro utilizada (20 mm de diâmetro e 30 cm de altura), para evitar a saída da fase estacionária. Em seguida, foram colocados cerca de 10 cm de sílica gel (High purity grade, pore size 60 Å, 220 – 440 mesh particle size, Sigma) na coluna. A sílica foi transferida para um béquer, onde foram adicionados cerca de 100 mL da fase móvel a ser utilizada. A mistura foi agitada durante 5 minutos e colocada lentamente na coluna de vidro, para evitar a formação de bolhas. A coluna foi deixada em repouso até que a fase móvel estivesse empacotada. Em seguida, a torneira da coluna foi aberta até que todo o volume morto da coluna fosse eluído. A coluna era preenchida com a fase móvel lentamente, para que não houvesse dispersão da fase estacionária e durante toda a cromatografia, foi deixado cerca de 1 cm de fase móvel sob a fase estacionária. O extrato quente concentrado preparado foi inserido na fase móvel e foram coletadas frações a cada 10 mL do eluato, as quais foram submetidas posteriormente ao EPEL.

3.7.3. Separação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com espectrômetro de massas de alta resolução (HPLC/MS)

Os cromatogramas e espectros de massas obtidos foram registrados em um equipamento de HPLC da Shimadzu Prominence [CBM-20A, SIL-20AC, LC-20AB (bomba binária) e detector SPD-M20A]. A saída do detector estava conectada a um espectrômetro de massas modelo MicroTOF-QII (Bruker Datonics, Billerica, MA) com ionização por meio de fonte de electrospray, sendo o espectrômetro de massas um QTOF (quadrupolo-tempo de voo). Em todos os casos, foram injetadas alíquotas de 100 µL do extrato quente concentrado, e analisadas no modo positivo (M+) e/ou no negativo (M-) de ionização.

3.7.3.1. Utilizando uma coluna Luna C₁₈ (2)

3.7.3.1.1. Modo isocrático

Foi utilizada uma coluna Luna C₁₈ (2), 250 x 4,6 mm (Phenomenex), com fluxo de 1,0 mL/min, e uma fase móvel composta por água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)), na proporção 27/73 em modo isocrático. As amostras injetadas foram eluídas durante 100 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.3.1.2. Modo gradiente

Foi utilizada uma coluna Luna C₁₈ (2), 250 x 4,6 mm (Phenomenex) com fluxo de 1,0 mL/min, sendo fase móvel composta por uma mistura água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)). O gradiente utilizado era composto por metanol variando de 30% até 45%, no intervalo de 0 a 45 minutos. As amostras injetadas foram eluídas durante 60 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.3.2. Utilizando uma coluna Synergi Polar-RP

Foi utilizada uma coluna Synergi Polar-RP, 250 x 4,6 mm (Phenomenex) com fluxo de 0,8 mL/min, sendo fase móvel composta por uma mistura água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)). Foram utilizados dois gradientes diferentes:

- Metanol variando de 20% até 60%, no intervalo de 0 a 30 minutos.
- Metanol variando de 30% até 60%, no intervalo de 0 a 30 minutos.

Todas as amostras injetadas nos dois gradientes foram eluídas durante 60 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.3.3. Utilizando uma coluna Synergi Max-RP

Foi utilizada uma coluna Synergi Max-RP, 250 x 4,6 mm (Phenomenex) com fluxo de 1,0 mL/min, sendo fase móvel composta por uma mistura água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (%v)). Foram utilizados quatro gradientes diferentes:

- Metanol variando de 30% até 45%, no intervalo de 0 a 30 minutos.
- Metanol variando de 30% até 45%, no intervalo de 0 a 45 minutos.
- Metanol variando de 30% até 60%, no intervalo de 0 a 30 minutos.
- Metanol variando de 30% até 60%, no intervalo de 0 a 45 minutos.

Todas as amostras injetadas nos dois gradientes foram eluídas durante 60 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.3.4. Utilizando uma coluna Acclaim® Mixed Mode HILIC-1

Foi utilizada uma coluna Acclaim® Mixed Mode HILIC-1 (Dionex), 250 x 4,6 mm (Phenomenex) com fluxo de 1,0 mL/min, sendo fase móvel composta por uma mistura água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (%v)). O gradiente utilizado era composto por metanol variando de 30% até 45%, no intervalo de 0 a 45 minutos. As amostras injetadas foram eluídas durante 60 min com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm.

3.7.4. Separação por extração em fase sólida (SPE)

O equipamento utilizado para os experimentos de purificação do precursor da luciferina via SPE era uma câmara de vácuo (“Vacuum Manifold” da Phenomenex) (Figura 7) acoplada a uma bomba de vácuo. A câmara continha, na sua parte superior, saídas com suportes para cartuchos de SPE, o que permitia acelerar o processo de eluição da fase móvel/eluato através do vácuo presente no interior da câmara. O cartucho com a fase estacionária desejada era

fixado na parte de cima da câmara, enquanto um tubo de ensaio de 5 mL era posicionado logo abaixo do cartucho, no interior da câmara.

Figura 7: Câmara de vácuo utilizada nos experimentos.

Inicialmente o vácuo era ligado e, em seguida, a fase móvel era colocada no cartucho de SPE. A fase móvel era eluída até o momento em que a mesma ficasse cerca de 0,5 centímetro acima da fase estacionária, e então, o vácuo era desligado. Esse procedimento garantia que a fase estacionária não secasse no decorrer do experimento. O tubo de ensaio no interior da câmara era repostado e então o extrato quente concentrado era colocado dentro do cartucho de SPE. Em seguida, a fase móvel era inserida lentamente no cartucho de SPE e o vácuo era novamente ligado. Durante todo experimento, a fase móvel sempre foi deixada 0,5 cm acima da fase estacionária.

3.7.4.1. Utilizando um cartucho Sep-Pak® Vac

Foi utilizado um cartucho Sep-Pak® Vac 6cc (500mg), C₁₈ da Waters. A fase móvel utilizada era composta por soluções de 2 mL contendo 0%, 20%, 40%, 60% e 80% de metanol (todas v/v). As soluções de metanol foram diluídas com uma solução aquosa contendo 0,025% HCOOH (v/v), pH 3,0 e 5 mM de DTT

(concentração final). A fase estacionária foi condicionada com uma solução aquosa contendo 0,025% HCOOH (v/v), pH 3,0 e 5 mM de ditioneitol. Em seguida, as fases móveis foram aplicadas no cartucho de SPE na ordem crescente da porcentagem de metanol em solução. Foram recolhidas frações de 2 mL e as mesmas foram testadas no EPEL.

3.8. Fracionamento da hispidina e da 3-hidróxi-hispidina

A hispidina (5 mg, Sigma-Aldrich) e a 3-hidróxi-hispidina (260 µg, cedida pelo Prof. Ilia Yampolsky, da Russian Academy of Sciences), utilizadas nos experimentos descritos neste relatório foram fracionadas em Eppendorfs. Os reagentes foram dissolvidos em acetona (Sigma-Aldrich), alíquotados e em seguida, o solvente foi evaporado com o auxílio de um concentrador (Savant Speed Vac Plus, modelo SC210A).

Para a hispidina, 1 mL de acetona foi adicionado no próprio frasco do reagente, que continha 5 mg de reagente. A solução foi homogeneizada com o auxílio de um agitador de tubos tipo vortex (Phoenix). Uma alíquota de 25 µL da solução foi colocada em um Eppendorf, e a mesma foi diluída 40 vezes com acetona, perfazendo 1000 µL de volume final de solução. Alíquotas de 100 µL dessa solução foram colocadas em Eppendorfs, que em seguida tiveram o seu solvente evaporado. Após evaporar o solvente, foram obtidos 10 Eppendorfs com aproximadamente 12,5 µg de hispidina cada. A solução inicial de hispidina também teve o seu solvente evaporado, e o reagente foi armazenado em um freezer a -20°C até posterior uso.

Os 260 µg de 3-hidróxi-hispidina disponíveis também foram dissolvidos em 1 mL de acetona. Uma alíquota de 500 µL dessa solução foi retirada e, em seguida, fracionada em alíquotas de 50 µL. Após evaporar o solvente, foram

obtidos 10 Eppendorfs com aproximadamente 13 µg de 3-hidróxi-hispidina cada. A solução inicial de 3-hidróxi-hispidina também teve o seu solvente evaporado, e o reagente foi armazenado em um freezer a -20°C até posterior uso.

3.9. Análises de fluorescência por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foram injetadas amostras de 50 µL do extrato quente concentrado e de uma solução 4 µM de hispidina no HPLC descrito no item 3.7.1. Foi utilizada com uma coluna C18, 250 x 4,6 mm (Phenomenex) com fluxo de 1,0 mL/min, utilizando como fase móvel um gradiente constituído por água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH), onde a proporção de metanol variava de 20-50% de 0-20 minutos. As amostras injetadas foram eluídas durante 30 min com detecção no UV/VIS em 360 nm e por fluorescência em λ_{exc} 360 nm e λ_{em} 490 nm.

3.10. Ensaio quimiluminescente padrão

A etapa da reação em fungos bioluminescentes responsável pela emissão de luz (2ª etapa, 3-hidróxi-hispidina com oxigênio molecular catalisada pela luciferase, Esquema 3), foi realizada de maneira *in vitro* no laboratório. Para quantificar a emissão de luz, foi utilizado um luminômetro de tubo (Berthold, modelo Sirius FB15).

O ensaio consiste em adicionar, em um tubo de ensaio, 150 µL de tampão fosfato (20 mM, pH 7, Sigma-Aldrich), 20 µL de uma solução 3,8 µM de 3-hidróxi-hispidina em acetona e 30 µL da fração do extrato frio rica em luciferase (0,60 mg/mL; Teste de Bradford) com albumina (1 mg/mL, Sigma-Aldrich), totalizando 200 µL de volume final. O teste de Bradford foi realizado antes da adição de albumina. A concentração final de 3-hidróxi-hispidina no tubo de ensaio é 380

nM. A emissão de luz foi registrada durante 3,5 min no luminômetro. Todas as reações foram feitas a 25°C e sob abrigo de luz.

3.11. Estudo da cinética da reação luciferina/luciferase

O ensaio quimiluminescente padrão foi realizado variando a concentração de 3-hidróxi-hispidina e o valor de pH do meio reacional, com objetivo de se observar/obter alguns parâmetros da cinética da reação, os quais ainda não foram descritos na literatura. Para quantificar a emissão de luz, foi utilizado um luminômetro de tubo (Berthold, modelo Sirius FB15). A emissão de luz é registrada durante 3,5 min no luminômetro.

Foram utilizados tampão fosfato (20 mM, Sigma-Aldrich) em diferentes pH (6, 7 e 8) e diferentes valores de concentração final da 3-hidróxi-hispidina em solução (76 nM, 152 nM, 304 nM, 380 nM e 760 nM). Ao todo, foram realizados 15 diferentes tipos de ensaios, todos em duplicata. A composição do meio reacional utilizado era idêntica a descrita no item anterior.

3.12. Espectro de fluorescência

As medidas de espectroscopia de absorção e de fluorescência foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Varian Eclipse, com agitação magnética e operando com a cela termostatzada a $25,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por um banho Lauda Brinkmann E100. A sensibilidade do aparelho foi regulada variando os parâmetros de voltagem da fotomultiplicadora e as aberturas das fendas de emissão ou excitação.

3.13. Espectrofotometria UV-vis

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Varian Cary 50 Probe, termoequilibrado por um banho Varian Cary PCB 150 a $25,0 \pm 0,5$ °C.

3.14. Estudo do mecanismo da reação luciferina/luciferase

3.14.1. Injeções dos padrões de reação

A 3-hidróxi-hispidina e um padrão de uma molécula candidata a oxiluciferina (Figura 8), gentilmente cedido pelo Prof. Ilia Yampolsky, foram injetados em um HPLC acoplado a um espectrômetro de massas, idêntico descrito no item 3.7.3. As amostras foram analisadas no modo negativo (M^-) de ionização.

Figura 8: Estrutura molecular da possível oxiluciferina.

Foi utilizada uma coluna Luna 3 μ m C₁₈ (2), 100 Å, 100 x 2 mm (Phenomenex) com fluxo de 200 μ L/min, sendo fase móvel constituída por um gradiente água/acetonitrila (A/B, com A contendo 0,1% de HCOOH). O gradiente utilizado era composto por acetonitrila variando da seguinte maneira:

- 5% – 30% no intervalo de 0 a 15 minutos;
- 30% – 95% no intervalo de 15 a 20 minutos;
- Constante em 95% de 20 a 22 minutos;
- 95% – 5% de 22 a 23 minutos;
- Constante em 5% de 23 a 30 minutos.

As amostras injetadas estavam dissolvidas em acetona, e as mesmas foram eluídas durante 30 min com detecção no UV/VIS em 360 nm.

3.14.2. Injeções do meio reacional do ensaio quimiluminescente padrão

Foram utilizados três diferentes procedimentos para injetar alíquotas do meio reacional do ensaio quimiluminescente padrão no HPLC, acoplado a um espectrômetro de massas, os quais serão descritos detalhadamente nos próximos itens. Os procedimentos adotados foram:

- Injeção direta;
- Concentração da alíquota por filtros moleculares;
- Concentração da alíquota via SPE-online (extração em fase sólida, solid phase extraction, SPE).

3.14.2.1. Injeção direta

O meio reacional utilizado era idêntico ao descrito no item 3.10. Foram retiradas 2 alíquotas de 50 µL cada, uma com 1 minuto de reação e outra após 30 minutos de reação.

As amostras foram injetadas em condições análogas as descritas no item 3.14.1., onde apenas a variação do gradiente era dessemelhante. O gradiente utilizado era composto por acetonitrila variando da seguinte maneira:

- 5% – 40% no intervalo de 0 a 15 minutos;
- 40% – 95% no intervalo de 15 a 20 minutos;
- Constante em 95% de 20 a 22 minutos;
- 95% – 5% de 22 a 23 minutos;
- Constante em 5% de 23 a 30 minutos.

As amostras injetadas foram eluídas durante 30 min com detecção no UV/VIS em 360 nm.

3.14.2.2. Concentração por filtros moleculares

O meio reacional utilizado era composto de 300 µL de tampão fosfato, 40 µL de uma solução 3,8 µM de 3-hidróxi-hispidina e 60 µL da fração do extrato frio rica em luciferase, totalizando 400 µL de volume final. A concentração final de 3-hidróxi-hispidina no tubo de ensaio é 380 nM. Foi retirada uma alíquota de 200 µL após 10 minutos de reação. Foram adicionados 10 µL de ácido fórmico para interromper a reação. Em seguida, foi utilizado um filtro molecular de centrifugação com corte de 3 kDa (Amicon® Ultra-0.5, Millipore) para concentrar a amostra. A mesma foi centrifugada (5 minutos, 14.000 × g, 4°C). O filtrado foi injetado no HPLC/MS nas mesmas condições descritas no item 3.14.1.

3.14.2.3. Concentração via SPE-online

Este método de concentração foi desenvolvido para que fosse possível concentrar as amostras injetadas no próprio equipamento de HPLC/MS. O método consiste em utilizar três bombas binárias (A, B e C, LC-20AB, Shimadzu) e um conjunto de válvulas para direcionar os fluxos da fase móvel. São utilizados 2 fluxos de fase móvel independentes, onde o fluxo proveniente das bombas A e B está direcionado para a coluna/DAD/MS, e o fluxo da bomba C está direcionado para o injetor/pré-coluna/descarte. Em seguida, as conexões das válvulas eram trocadas, processo esse feito pelo software do equipamento, e o fluxo proveniente das bombas A e B era direcionado para a pré-coluna/coluna/DAD/MS (ocorria o “back flush” na pré-coluna), e o fluxo da bomba C era direcionado para o injetor/descarte (Figura 9).

Figura 9: Posicionamento das válvulas durante o processo de SPE-online. O sentido das flechas indica o sentido do fluxo da fase móvel e os círculos com os números representam as válvulas.

Foi utilizada uma pré-coluna Synergi Polar, 10 x 2 mm (Phenomenex) e uma coluna Luna C₁₈ (2), 100 x 2 mm. (Phenomenex). A fase móvel proveniente das bombas A e B era constituída por um gradiente água/acetonitrila (A/B, com A contendo 0,1% de HCOOH), com fluxo de 200 µL/min. O gradiente utilizado era composto por acetonitrila variando da seguinte forma:

- Constante em 20% de 0 a 3 minutos;
- 20% – 35% no intervalo de 3 a 10 minutos;
- 35% – 95% no intervalo de 10 a 12 minutos;
- Constante em 95% de 12 a 15 minutos;

- 95% – 20% de 15 a 16 minutos;
- Constante em 20% de 16 a 20 minutos.

A fase móvel proveniente da bomba C era composta por água contendo 0,1% de HCOOH, com fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. A troca da conexão das válvulas acontecia aos 2 minutos de corrida, e as mesmas voltavam a posição inicial aos 18 minutos de corrida. Foi injetada uma alíquota de 50 μL , logo após a adição da 3-hidróxi-hispidina, de um meio reacional idêntico ao descrito no item 3.10. As amostras injetadas foram eluídas durante 30 min com detecção no UV/VIS em 360 nm.

3.14.3. Estudo do consumo de luciferina e formação da possível oxiluciferina na reação luciferina/luciferase

Para o estudo do consumo de luciferina e formação da possível oxiluciferina na reação luciferina/luciferase, foi utilizado um meio reacional análogo ao descrito no item 3.10, onde o meio reacional utilizado era composto por 1500 μL de tampão fosfato (20 mM, pH 7, Sigma-Aldrich), 200 μL de solução 3,8 μM de 3-hidróxi-hispidina em acetona e 300 μL da fração do extrato frio rica em luciferase, perfazendo 2000 μL de volume final. A concentração final de 3-hidróxi-hispidina no tubo de ensaio é 380 nM. Uma alíquota de 100 μL foi retirada logo após a adição da 3-hidróxi-hispidina. A mesma foi colocada em tubo de ensaio, que foi inserido no luminômetro, para acompanhar a emissão de luz. A emissão foi acompanhada durante 50 minutos. Alíquotas de 150 μL foram retiradas do meio reacional a cada minuto, durante 10 minutos. Também foram retiradas alíquotas após 20 e 30 min de reação. Em todas as alíquotas foram adicionados 10 μL de ácido fórmico para parar a reação. As alíquotas foram imediatamente armazenadas a -20°C até a sua injeção no equipamento de

HPLC/MS. A condição utilizada para as análises era idêntica a descrita no item 3.14.2.3.

3.14.4. Estudo do consumo de luciferina e formação da possível oxiluciferina em tampão fosfato

Os padrões da reação luciferina/luciferase foram dissolvidos em tampão fosfato (20 mM, pH 7, Sigma-Aldrich), e alíquotas foram retiradas das soluções logo após a preparação das mesmas e após 30 min da preparação. As alíquotas foram injetadas no equipamento de HPLC/MS, utilizando uma condição análoga a descrita no item 3.14.2.3, onde apenas o gradiente foi variado. O gradiente utilizado era composto por acetonitrila, variando-se da seguinte maneira:

- Constante em 10% de 0 a 3 minutos;
- 10% – 45% no intervalo de 3 a 18 minutos;
- 45% – 95% no intervalo de 18 a 20 minutos;
- Constante em 95% de 20 a 24 minutos;
- 95% – 10% de 24 a 25 minutos;
- Constante em 10% de 25 a 30 minutos.

As amostras injetadas foram eluídas durante 30 min com detecção no UV/VIS em 360 nm.

3.14.5. Marcação isotópica da possível oxiluciferina com $^{18}\text{O}_2$

Neste procedimento, o ensaio padrão quimiluminescente foi realizado sob atmosfera de $^{18}\text{O}_2$, para que fosse possível verificar o mecanismo de formação da possível oxiluciferina. Para tal, foi produzida uma vidraria específica (Figura 10). Um cilindro de $^{18}\text{O}_2$ (Sigma-Aldrich) foi conectado na posição 1, e uma bomba de vácuo foi conectada na posição 3. Inicialmente, 1500 μL de tampão fosfato (20 mM, pH 7, Sigma-Aldrich) foram adicionados na posição 2,

juntamente com um agitador magnético, e o sistema foi vedado com o auxílio de um septo. O O_2 dissolvido no tampão foi retirado através de sucessivos congelamentos/descongelamentos da solução. Para isso, um banho de gelo seco e etanol era posicionado na posição 2. O banho era retirado após o congelamento do tampão, a válvula da posição 3 era aberta e a bomba de vácuo era ligada. Após o descongelamento do tampão, a bomba era desligada e a válvula da posição 3 era fechada. O procedimento foi repetido diversas vezes, até não serem observadas bolhas na solução.

Figura 10: Vidraria utilizada no experimento de marcação isotópica.

Em seguida, a válvula da posição 1 foi aberta e o $^{18}O_2$ foi inserido lentamente na atmosfera do sistema, que estava sob vácuo. A válvula da posição 3 foi aberta e bomba de vácuo ligada com o intuito garantir a ausência de traços de O_2 no sistema. Ambas foram fechadas instantes depois. Foram inseridos, através do septo e com o auxílio de uma seringa (Hamilton), 200 μL de uma solução 3,8 μM de 3-hidróxi-hispidina em acetona e 300 μL da fração do extrato

frio rica em luciferase, perfazendo 2000 μL de volume final. A concentração final de 3-hidróxi-hispidina no sistema é 380 nM. A pressão interna do sistema foi mantida em 10 psi. A reação ocorreu sob agitação, e alíquotas de 250 μL foram retiradas a cada 5 min, durante 20 min. Em todas as alíquotas foram adicionados 10 μL de ácido fórmico para parar a reação. As alíquotas foram imediatamente armazenadas a -20°C até posterior uso. Logo após a retirada da última alíquota, foi adicionada uma alíquota de uma solução 10 mM de antraceno-9-10-divinilsulfonato (AVS, Figura 11), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Paolo Di Mascio, bem como o $^{18}\text{O}_2$. O sistema foi deixado por 30 min sob uma lâmpada UV-vis (365 nm, 400 W), e uma alíquota de 250 μL também foi coletada. É importante mencionar que mesmo com esse procedimento, em nenhum momento a reação deixou de ocorrer em um sistema fechado, uma vez que a vedação do sistema já tinha sido testada previamente.

Figura 11: Estrutura molecular do antraceno-9-10-divinilsulfonato (AVS).

As alíquotas foram injetadas em um equipamento de HPLC/MS nas mesmas condições descritas no item 3.14.2.3.1.

4. Resultados e discussão

4.1. Explorações iniciais

Em 2010, Oliveira propôs em sua tese de doutorado (Oliveira 2010) uma metodologia para a purificação do precursor da luciferina fúngica (Figura 12). Tal procedimento consistia, basicamente, em purificar o precursor da luciferina através de três passagens por um equipamento de HPLC, cada uma com uma condição diferente. Após a injeção do extrato quente concentrado na primeira passagem pelo HPLC, o pico cromatográfico correspondente ao precursor da luciferina era recolhido, e o mesmo passava por uma medida de intensidade de emissão de luz através do EPEL. Em seguida, a alíquota recolhida era armazenada e congelada imediatamente até as injeções seguintes.

Figura 12: Fluxograma do procedimento para purificação da luciferina fúngica, descrito por Oliveira (2010).

Experimentos realizados pelo autor desta presente tese na sua iniciação científica, juntamente com o ex-aluno do grupo, hoje Prof. Dr. Anderson G.

Oliveira (Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo), resultaram, após sucessivas purificações das frações coletadas, na obtenção de material suficiente para realização de análises de RMN ^1H , Cosy, HMBC e HSQC. Porém, não foi possível obter nenhuma informação relevante sobre a natureza da estrutura molecular do precursor da luciferina fúngica (a hispidina), devido tanto a presença de impurezas da amostra analisada, quanto pela baixa quantidade do precursor da luciferina presente na alíquota utilizada. Vale lembrar que o Prof. Oliveira partiu de cerca de 500 g de corpos de frutificação desidratados para obter (de forma otimista) somente alguns microgramas do precursor da luciferina ao final da metodologia.

Ao contrário do que foi definido inicialmente (Figura 12), acreditava-se que o tempo demasiadamente longo necessário para se purificar a luciferina através desta metodologia, aliada com o grande manuseio das amostras, nem sempre podendo evitar a decomposição (ao abrigo de luz e sob atmosfera de argônio), prejudicam muito o rendimento do processo. Deste modo, para que fosse possível obter frações com quantidade maior de luciferina e que a mesma permanecesse intacta até que as análises estruturais fossem realizadas, mudanças na metodologia inicial proposta foram realizadas, as quais serão descritas detalhadamente nos próximos itens.

4.2. Ensaio padrão de emissão de luz (EPEL)

O EPEL é um ensaio que permite a determinação qualitativa da presença do precursor da luciferina fúngica em uma determinada amostra. Mais especificamente, o ensaio possibilita a detecção da molécula de interesse nos extratos quentes preparados, e também a identificação do pico cromatográfico corresponde a molécula de interesse durante o seu processo de purificação por

HPLC. Desta maneira, pode-se dizer que o funcionamento apropriado do EPEL é de extrema importância para o decorrer desta pesquisa, uma vez que com ele é possível identificar se realmente alguma amostra ou alíquota coletada possui de fato a luciferina, sendo até o presente momento, o único método para a determinação qualitativa da molécula de interesse.

Como descrito no item 3.2., o extrato frio foi preparado utilizando o micélio do fungo *N. gardneri*, cultivado sob uma membrana de diálise em um meio de cultura de ágar. A figura 13 mostra as curvas de emissão de luz obtidas com o EPEL utilizando o tampão de extração de enzimas (branco), e para uma amostra de extrato quente (fonte do precursor da luciferina fúngica, preparado conforme descrito no item 3.3.1.1.).

Figura 13: Curvas típicas de emissão de luz obtidas com o EPEL utilizando tampão de extração de enzimas (branco) e o extrato quente.

Pode-se dizer, portanto, que a emissão de luz observada na figura 13 ocorre devido à presença do precursor da luciferina no extrato quente. Nota-se que também que há emissão de luz no branco realizado, constatando a presença do precursor luciferina no extrato frio. Porém, o mesmo não se encontra em

quantidade suficiente para interferir na realização do EPEL. Deste modo, a partir daqui, os ensaios de emissão de luz realizados serão descritos como positivos ou negativos. Quando o precursor da luciferina está presente na amostra, é observado um aumento significativo na intensidade de emissão de luz em relação ao branco, e se diz que EPEL foi positivo ou que ele teve atividade positiva. Quando o precursor da luciferina não está presente na amostra, a intensidade de emissão de luz não aumenta em relação ao branco, e se diz que EPEL foi negativo ou que ele não possuía atividade.

4.3. Extração acelerada por solvente

Um problema abordado durante a execução do projeto foi em relação a atividade do precursor da luciferina. Por ser uma molécula sensível a diversos fatores (e.g. luz, oxigênio e pH elevado), o precursor da luciferina acaba se degradando durante o processo de purificação, uma vez que os procedimentos adotados são repetidos inúmeras vezes. Consequentemente, para que seja possível a elucidação da estrutura molecular do precursor da luciferina, é necessária uma quantidade elevada de corpos de frutificação desidratados do cogumelo *N. gardneri*. Uma vez que as tentativas de cultivo *in vitro* não foram bem sucedidas, testes a fim de prolongar a atividade do precursor da luciferina foram realizados, pois a obtenção dos corpos de frutificação depende tanto da sazonalidade dos mesmos, quanto da disponibilidade de pesquisadores e alunos de pós-graduação para coletá-los em Altos, PI. Vale lembrar que, ao longo de todos os experimentos realizados, todas as transferências de recipientes dos extratos quente foram realizadas o mais rapidamente possível, sendo os mesmos sempre colocados sob atmosfera de argônio, lacrados, colocados sob banho de gelo e ao abrigo de luz.

Inicialmente, foi modificada a solução de extração utilizada para a produção do extrato quente. Ao invés de utilizar uma solução com BME, foi utilizado DTT. A escolha é justificada pelo fato de o DTT ser um melhor agente redutor quando comparado com o BME (Aitken *et al.* 2008). Foram comparados extratos quente obtidos através de extrações utilizando solução 0,025% H₂O/HCOOH, pH 3,0, contendo 20 mM de BME, com outra contendo 0,025% H₂O/HCOOH, pH 3,0 e 2 mM de DTT, concentração essa escolhida arbitrariamente, apenas para testes preliminares. É importante lembrar que a mistura de corpos de frutificação desidratados e moídos do fungo *N. gardneri* mais Celite 545® foi homogeneizada o máximo possível, para depois ser dividida em duas partes idênticas, a fim de garantir que haveria a mesma quantidade inicial de luciferina nas células de extração. Os extratos quentes obtidos foram testados no EPEL, e os resultados podem ser observados na figura 14.

Figura 14: Curvas de emissão de luz obtidas com o EPEL utilizando o tampão de extração de enzimas (branco) e extrato quente preparado com diferentes soluções de extração: BME e DTT.

Observa-se que a emissão de luz utilizando o extrato quente extraído com uma solução de DTT é cerca de três vezes maior do que a emissão de luz do extrato quente extraído com uma solução de BME. Por ser um agente redutor melhor, o DTT faz com que um número menor de moléculas do precursor da luciferina sejam oxidadas durante a extração. Consequentemente, a emissão de luz é maior.

Uma vez que foi demonstrado que a solução de extração com DTT prolonga a atividade do precursor da luciferina, foram realizados experimentos a fim de determinar a concentração ideal de DTT, uma vez que já era sabido que existia uma concentração ideal de BME que permitia obter uma maior intensidade de emissão de luz no EPEL (Oliveira 2010). Extratos quentes foram preparados utilizando soluções de extração com diversas concentrações de DTT, 0,5, 1, 2, 5 e 10 mM, todos contendo 0,025% H₂O/HCOOH, pH 3,0. Novamente, a mistura de corpos de frutificação desidratados e moídos do fungo *N. gardneri* mais Celite 545® foi homogeneizada o máximo possível, para depois ser inserida nas células de extração, com o propósito de garantir a mesma quantidade inicial do precursor da luciferina nas células de extração. Os extratos obtidos foram testados com o EPEL, conforme mostra a figura 15.

Figura 15: Curvas de emissão de luz obtidas com extratos quentes preparados com soluções de extração de DTT de diferentes concentrações: 0,5, 1, 2, 5 e 10 mM.

Observa-se que há uma diferença na intensidade de emissão de luz nos brancos das figuras 14 e 15, assim como na intensidade de emissão de luz no EPEL com extratos quentes que utilizavam uma solução de extração com 2mM de DTT. Isso ocorre pois os experimentos foram realizados utilizando extratos frios diferentes, e consequentemente, as atividades/quantidade de enzimas responsáveis pela emissão de luz eram diferentes. Mesmo assim, é possível verificar que existe uma concentração ideal de DTT para ser utilizada na solução de extração. Até 5 mM de DTT, a intensidade de luz aumenta conforme o aumento da concentração de DTT na solução de extração. Quando se utiliza uma solução de DTT 10 mM, o agente redutor inibi o EPEL, uma vez que é observada uma diminuição da intensidade de emissão de luz. Isso ocorre pois o DTT, em elevadas concentrações, pode interferir com a estrutura quaternária das enzimas responsáveis pela bioluminescência, diminuindo suas atividades. Desta maneira, foi estabelecido que a solução padrão de extração seria composta por 0,025% H₂O/HCOOH, pH 3,0, contendo DTT 5 mM.

4.4. Extração quimicamente ativa

Um dos fatores que dificultava a realização da extração quimicamente ativa é a formação de uma emulsão quando o acetato de etila é adicionado. Como a luciferina se oxida facilmente, não é possível esperar que as fases se separem no funil de separação. Tentativas de acelerar a separação de fases adicionando NaCl à mistura não apresentaram nenhuma melhora na separação das fases. Deste modo, fez-se necessário utilizar centrifugação. Após a centrifugação, é possível distinguir a fase aquosa da orgânica, e também é observada uma camada de lipídeos entre as fases. O grande problema deste método está no manuseio do extrato, uma vez que é necessário transferir o extrato do funil de extração para o tubo do tipo *Falcon*[®], e vice-versa, por diversas vezes. O contato do extrato com uma atmosfera não inerte acaba por oxidar a luciferina.

Assim sendo, foi definido que seria desenvolvido um método capaz de “quebrar” a emulsão formada na extração quimicamente ativa. Inicialmente, o procedimento utilizado foi análogo ao descrito no item 3.4.2., apenas se diferenciando pela adição de etanol a mistura (5% do volume total da mistura). O etanol foi adicionado com o propósito de melhorar a solubilidade dos lipídeos na fase aquosa, evitando assim a formação da emulsão. Porém, nenhum resultado satisfatório foi obtido. Em seguida, foram realizadas extrações quimicamente ativas utilizando as seguintes proporções: 1:1 (v/v) de acetato de etila e água, respectivamente, com 5% do volume total de etanol e 2:1 (v/v) de acetato de etila e água, respectivamente, e com 5% do volume total de etanol, onde a extração quimicamente ativa era realizada apenas uma vez. Após agitação do funil de extração, foi observada a separação instantânea das fases

somente na extração que utilizava a proporção 2:1 (v/v) de acetato de etila e água. Tal observação pode ser explicada pela presença de compostos parcialmente solúveis em acetato de etila na emulsão, sendo que o excesso do solvente orgânico fez com que os mesmos se solubilizassem na fase orgânica. Posteriormente, optou-se por fazer as extrações quimicamente ativas em um frasco Schott, e em seguida, transferindo a mistura para uma proveta, para que fosse possível retirar a maior quantidade de fase orgânica o mais rapidamente possível, minimizando o manuseio do extrato em atmosfera não-inerte. Então, a fase orgânica foi concentrada com o auxílio de um rotaevaporador e armazenada para uso futuro.

4.5. Purificação do precursor da luciferina fúngica

Como já citado anteriormente, acredita-se que uma metodologia de longa duração para a purificação do precursor da luciferina fúngica pode ter sido um dos principais motivos para o insucesso da elucidação de sua estrutura molecular, uma vez que não foi possível obter uma quantidade suficientemente alta da molécula purificada. Pode-se dizer que uma baixa quantidade final é obtida devido a degradação da mesma durante o seu processo de purificação. Por isso, decidiu-se eliminar as etapas I e II da passagem no HPLC (Figura 12). Ponderou-se que, eliminando tais etapas, a amostra final do precursor da luciferina teria uma menor probabilidade de se degradar durante seu processo de purificação. Inicialmente, amostras do extrato quente concentrado foram injetadas em um equipamento de HPLC, nas condições descritas no item 3.7.1.1. O cromatograma obtido é mostrado na figura 16.

Figura 16: Cromatograma obtido através da injeção do extrato quente concentrado em um equipamento de HPLC. O pico cromatográfico destacado (*) corresponde ao precursor da luciferina fúngica, e foi determinado através da constatação de uma atividade positiva no EPEL. Fase estacionária: Luna C₁₈ (2), 250 x 4,6 mm; Fase móvel: água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)), 27/73 em modo isocrático; Detecção no UV/VIS: 320 nm e 365 nm.

Frações foram coletadas em intervalos de 5 min, durante todo o experimento, para identificar qual pico do cromatograma era correspondente ao precursor da luciferina. Foi constatado que o pico detectado em 88 min, assinalado com um asterisco, era correspondente à molécula de interesse, já que foi observada atividade positiva no EPEL, conforme mostra a figura 17. É importante novamente lembrar que o controle mostra emissão de luz, pois o extrato frio sempre contém um pouco de precursor de luciferina.

Figura 17: Curvas de emissão de luz obtidas com o EPEL utilizando o controle e a fração coletada do HPLC em 88 min.

Apesar do sucesso obtido na identificação do pico correspondente ao precursor da luciferina, julgou-se muito alto o tempo necessário para coletar as frações (88 min) com a luciferina, podendo ocorrer a degradação da molécula ao longo do percurso. Com isso em mente, foi utilizada uma coluna Synergi Polar-RP, uma vez que a mesma possui um tipo de seletividade distinta quando comparada com a Luna C₁₈ (2). A seletividade da fase estacionária da coluna Luna C₁₈ (2) possibilita uma maior interação de compostos apolares/ hidrofóbicos com a fase estacionária. Já na coluna Synergi Polar-RP, a sua fase estacionária possibilita uma maior interação com compostos polares e aromáticos. Deste modo, com a intenção de diminuir o tempo para a coleta do pico correspondente a luciferina, utilizou-se o método descrito no item 3.7.1.2.1. O cromatograma obtido é mostrado na figura 18.

Figura 18: Cromatograma obtido através da injeção do extrato quente concentrado em um equipamento de HPLC. Fase estacionária: Synergi Polar_RP, 250 x 4,6 mm; Fase movél: água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)), em um gradiente variando B de 0-20% no intervalo de 0-5 minutos, 20-80% no intervalo de 5-15 minutos, constante em 80% no intervalo de 15-25 minutos e 80-0% no intervalo de 25-26 minutos; Detecção no UV/VIS: 320 nm e 365 nm.

Novamente, foram recolhidas frações a cada 5 min. Porém, antes de serem submetidas ao EPEL, o metanol foi retirado das frações com o auxílio de um rotaevaporador. É de conhecimento que a presença de solventes orgânicos pode diminuir bastante a eficiência da emissão de luz (Shimomura 2006). Feito isso, as frações coletadas finalmente foram submetidas ao EPEL. Contudo, não foi detectada nenhuma atividade no EPEL, com nenhuma das frações coletadas. A primeira hipótese levantada para explicar o ocorrido era de que o precursor da luciferina não tinha sido eluída durante a corrida, por isso não houve atividade no EPEL. Porém, baseando-se no tempo de retenção da luciferina observado com a coluna C₁₈ (88 min, Figura 16), é razoável afirmar que tal hipótese não é válida. Por possuir um tempo de retenção elevado, supõe-se que o precursor da luciferina tenha uma forte interação com a fase estacionária da coluna, ou seja, o precursor da luciferina está relativamente apolar nas condições da corrida e por isso interage com a fase estacionária. Uma vez que o gradiente utilizado no

experimento chega a 80% de metanol na composição da fase móvel, o precursor da luciferina deveria ser eluída durante a corrida, pois como o metanol é mais apolar que a água, a interação entre o precursor da luciferina e a fase móvel seria maior do que a interação entre o precursor da luciferina e a fase estacionária.

A segunda hipótese seria que alguma das frações coletadas poderiam sim conter o precursor da luciferina, porém o mesmo estaria em uma concentração muito baixa para ser detectada a sua atividade no EPEL. Sabe-se que existe uma faixa adequada de diluição de uma solução do precursor da luciferina para a realização do EPEL, a qual pode favorecer ou não a emissão de luz (Oliveira 2010). Foi descrito que, conforme o fator de diluição do precursor da luciferina aumenta, mantendo-se constante a quantidade de enzimas, a intensidade de luz também aumenta. Porém, para fatores de diluição superiores a 20 vezes, a intensidade de luz torna a diminuir novamente. Este efeito poderia ser explicado pela formação de um dímero do substrato ou por algum tipo de inibição da enzima, quando na presença de quantidades muito altas do substrato. Por isso, todas as frações coletadas foram passadas para a fase orgânica, para serem concentradas com o auxílio de um rotaevaporador. O procedimento utilizado é análogo ao descrito no item 3.7.1.2.1. Feito isso, as frações concentradas foram testadas no EPEL. Todavia, mesmo assim, nenhuma fração apresentou atividade frente ao EPEL. O experimento foi realizado novamente, só que foram efetuadas três injeções do extrato concentrado no HPLC, ao invés de uma, e as frações provenientes dessas injeções foram coletadas exatamente no mesmo intervalo. Após a concentração das frações, nenhuma fração apresentou atividade frente ao EPEL.

Considerou-se, portanto, que a elevada porcentagem de metanol presente na fase móvel poderia degradar o precursor da luciferina. Por isso foi realizado mais um experimento utilizando a coluna Synergi Polar-RP. Porém agora, utilizando fluxo isocrático ao invés de um gradiente, conforme descrito no item 3.7.1.2.2. O cromatograma obtido é mostrado na figura 19.

Figura 19: Cromatograma obtido através da injeção do extrato quente concentrado em um equipamento de HPLC. Fase estacionária: Synergi Polar-RP, 250 x 4,6 mm; Fase móvel: água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (%)), 27/73 em modo isocrático; Detecção no UV/VIS: 320 nm e 365 nm.

As frações foram novamente coletadas em um intervalo de 5 min, e em seguida, foram submetidas ao EPEL. Contudo, nenhuma atividade foi observada no EPEL. É válido mencionar que as frações foram testadas diretamente, sem a remoção do metanol da solução. Como mostra a figura 17, é possível observar emissão de luz com a composição da fase móvel utilizada no experimento. Deste modo, pode-se concluir que o precursor da luciferina não foi eluído no tempo de análise determinado ou que eluiu com alguma substância que inibe a sua atividade no EPEL. Não foram realizados experimentos posteriores utilizando um tempo de análise maior, pois foi avaliado que o tempo de análise era relativamente alto e ainda não havia ocorrido a eluição da molécula de interesse.

Em vista destes problemas, tentativas de purificar o precursor da luciferina por um procedimento mais eficiente foram realizadas. Considerou-se então que, ao invés de utilizar um método cromatográfico no qual há uma interação entre a fase estacionária e o precursor da luciferina, seria utilizado um método que proporcionaria uma interação entre as impurezas contidas no extrato concentrado e a fase estacionária, sendo o precursor da luciferina eluído rapidamente. Esta etapa funcionaria como um “clean-up” do extrato quente concentrado. Em seguida seria utilizado um método cromatográfico que seria baseado na interação entre a fase estacionária e o precursor da luciferina, que devido à ausência de grande parte das impurezas, seria realizado com um tempo de análise baixo. Baseado nos resultados obtidos com as injeções do extrato concentrado no HPLC utilizando a coluna Luna (2) C₁₈, foi decidido que iria ser realizada uma separação por extração em fase sólida com sílica gel, conforme descrito no item 3.7.2. A sílica foi escolhida como fase estacionária, visto que ela é consideravelmente polar e haveria interação entre ela e os compostos que são eluídos no início da corrida cromatográfica descrita no item 3.7.1.1 (Figura 16). Portanto, os mesmos ficariam retidos na fase estacionária. Já o precursor da luciferina seria eluído rapidamente, pois o mesmo se encontra relativamente apolar nas condições do extrato quente concentrado, e com isso não haveria interação entre ele e a fase estacionária.

Devido à necessidade de se utilizar uma fase móvel apolar, foi realizada uma extração quimicamente ativa com o extrato quente, o qual foi concentrado até ser obtido aproximadamente 1 mL de extrato em fase orgânica (no caso, o extrato foi mantido em acetato de etila). Em seguida, foram realizados testes com TLC a fim de verificar em qual fase móvel o experimento seria realizado,

conforme descrito no item 3.7.2. É importante afirmar que, mesmo sendo possível visualizar a separação dos compostos contidos no extrato após a revelação das placas, não há como afirmar que alguma das manchas observadas na placa de TLC seja correspondente ao precursor da luciferina. Apenas é evidenciado que os compostos orgânicos presentes no extrato podem ser eluídos na condição utilizada. Após a revelação das placas de TLC utilizando uma lâmpada de UV-vis, e em seguida, a imersão das placas em ácido fosfomolibdico, a única fase móvel que exibiu uma corrida favorável à eluição da luciferina foi a fase móvel constituída por 8:2 (v/v) de acetato de etila e hexano, respectivamente, e 0,05% de HCOOH (v/v), uma vez que foram observadas manchas ao longo da placa de TLC, inclusive uma na linha do solvente. Nas demais placas, foram observadas manchas na região próxima onde o extrato quente concentrado foi inserido, com o auxílio de um capilar de vidro.

Antes da execução do experimento, foram realizados alguns testes com o EPEL, que consistiam em observar a intensidade de luz emitida utilizando a fase móvel utilizada no lugar do tampão fosfato de extração (neste caso, este ensaio é o branco), e utilizando o extrato quente concentrado dissolvido na fase móvel em questão, como mostra a figura 20.

Figura 20: Curvas de emissão de luz obtidas no EPEL utilizando a fase móvel no branco e o extrato quente concentrado dissolvido na fase móvel.

Observa-se que, mesmo na presença da fase móvel, o EPEL possui atividade positiva (Figura 20). É possível identificar a presença do precursor da luciferina na fase móvel, uma vez que a intensidade de emissão de luz é consideravelmente maior. Apesar de a fase móvel (fase orgânica) ser imiscível nas demais soluções que compõem o EPEL (fase aquosa), e do precursor da luciferina se particionar preferencialmente na primeira, é possível afirmar que uma fração das moléculas do precursor da luciferina está particionada na fase aquosa, já que é observado aumento na intensidade de emissão de luz. O resultado obtido, neste caso, permite que as frações coletadas durante a separação sejam testadas diretamente no EPEL, não havendo mais necessidade das mesmas estarem na fase aquosa.

Desta maneira, foi dada continuidade à separação, através de cromatografia em coluna com sílica. O extrato quente dissolvido em acetato de etila foi adicionado à fase móvel e a separação foi iniciada. Foram coletadas 10 frações a cada 6 minutos, ao longo de aproximadamente 60 min. Era esperado

que o precursor da luciferina estivesse presente nas primeiras frações coletadas. Porém, nenhuma fração apresentou atividade frente ao EPEL. Em um primeiro momento, foi considerado que alguma das frações coletadas poderia conter o precursor da luciferina, porém o mesmo estaria com uma concentração muito baixa e por isso não era observada atividade no EPEL. Então as frações foram concentradas com o auxílio de um rotaevaporador e testadas novamente. Mais uma vez, nenhuma emissão de luz foi observada. Então, foi inferido que o precursor da luciferina estava sendo decomposto durante a separação, apesar das precauções tomadas durante o decorrer do experimento. Mesmo assim, mais um experimento foi realizado, porém a altura da coluna de sílica gel utilizada foi reduzida pela metade. A medida foi adotada para que a eluição do precursor da luciferina ocorresse de forma mais rápida, evitando assim a sua degradação. Mais uma vez, nenhuma emissão de luz foi detectada.

Frente aos resultados obtidos, conclui-se que a maneira mais eficiente para conseguir obter quantidade significativa do precursor da luciferina para análises de determinação estrutural é através de sua purificação por equipamento de HPLC utilizando o método cromatográfico descrito no item 3.7.1.1. Logo, foi preparado um extrato quente concentrado partindo de cerca de 15 g de corpos de frutificação secos e desidratados, cujo extrato foi injetado seguidas vezes no HPLC. As frações correspondentes ao precursor da luciferina foram coletadas e armazenadas sob argônio a baixa temperatura (-20°C). O volume coletado das frações totalizou aproximadamente 10 mL. Em seguida, o metanol foi retirado de solução com o auxílio de um rotoevaporador, e a amostra obtida foi liofilizada (Thermo Savant - Micro Modulyo) a -50°C, sob vácuo e abrigo de luz, e dissolvida com 500 µL de uma solução aquosa contendo 0,025%

HCOOH (v/v), pH 3,0 e 5 mM de DTT. Feito isso, uma alíquota de 50 µL da amostra concentrada do precursor da luciferina foi reinjetada no HPLC, para ver se era possível detectar o pico cromatográfico correspondente ao precursor da luciferina em seu respectivo tempo de retenção. Porém, o mesmo não foi detectado (Figura 21). Para averiguar de fato a presença da molécula de interesse na amostra em questão foi realizado o EPEL, como mostra a figura 22.

Figura 21: Cromatograma obtido através da injeção da amostra concentrada do precursor da luciferina em um equipamento de HPLC. Fase estacionária: Synergi Polar-RP, 250 x 4,6 mm; Fase móvel: água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)), 27/73 em modo isocrático; Detecção no UV/VIS: 320 nm e 365 nm.

Figura 22: Curvas de emissão de luz obtidas no EPEL utilizando a fase móvel (água + 0,025% de HCOOH (%v) /metanol; 27/73) do HPLC no branco e a amostra concentrada do precursor da luciferina purificada, reinjetada no HPLC.

Comprovou-se que a o precursor da luciferina está presente na amostra concentrada, pois a mesma apresenta uma atividade positiva frente ao EPEL (Figura 22). Entretanto, nota-se que a concentração do mesmo, inferida pela intensidade do pico cromatográfico possivelmente correspondente ao precursor da luciferina (em torno de 90 min), deve ser mais baixa quando comparada ao extrato quente concentrado (Figura 16). Este fato pode ser justificado pela degradação do precursor da luciferina ao longo da sua purificação por HPLC. Por este motivo, para que fosse possível obter dados em relação a massa molecular do precursor da luciferina fúngica, optou-se por realizar os experimentos de espectroscopia de massas utilizando diretamente os extratos quentes concentrados nas condições descritas no item 3.7.1.1, ao invés de coletar frações purificadas do precursor da luciferina e concentrar a amostra final obtida, como descrito anteriormente.

Assim sendo, para finalmente obter algum tipo de dado em relação a fórmula/massa molecular do precursor da luciferina fúngica, foram realizados

experimentos em um HPLC acoplado a um espectrômetro de massas. Alíquotas de 100 μL de um extrato quente concentrado foram injetadas no equipamento, no modo positivo de ionização, utilizando as condições descritas no item 3.7.3.1.1.

Figura 23: Cromatograma obtido da purificação do extrato quente concentrado com a coluna Luna C₁₈ (2) em um HPLC acoplado a um espectrômetro de massas. O pico cromatográfico destacado (*) corresponde ao precursor da luciferina.

A figura 23 mostra o cromatograma obtido. O pico assinalado com (*) foi recolhido e testado no EPEL. Como já era esperado, confirmou-se que a molécula de interesse foi eluída no pico em torno de 83 min, uma vez que o EPEL apresentou uma atividade positiva. A diferença entre o tempo de retenção do precursor da luciferina se deve, muito provavelmente, a utilização de diferentes soluções aquosas contendo 0,025% HCOOH (v/v), pH 3,0 e 5 mM de DTT, utilizadas para dissolver o extrato quente, após a sua concentração no rotoevaporador (Item 3.5).

Ao analisar o espectro de massas do pico cromatográfico correspondente ao precursor da luciferina fúngica, observou-se que diversos íons (Figura 24) estavam co-eluído na região de interesse. Em outras palavras, significava que

o precursor da luciferina não estava devidamente purificado para posteriores experimentos de determinação estrutural. Destaca-se que, diante desse fato, não era mais correto afirmar que o pico cromatográfico com atividade positiva no EPEL era correspondente ao precursor da luciferina, uma vez que havia diversas moléculas presentes no pico cromatográfico em questão. Deste modo, era necessário verificar qual íon era correspondente ao precursor da luciferina fúngica, para assim dar continuidade ao projeto.

Figura 24: Espectro de massas obtido do pico do cromatograma com atividade positiva no EPEL, no modo positivo de ionização.

Para determinar qual íon era correspondente ao precursor da luciferina, fez-se o uso de um artifício do software utilizado (Bruker Daltonics DataAnalysis) para a análise de dados. Executando a função “Extract Ion Chromatogram” (EIC), é possível determinar em qual tempo de retenção um íon com determinado m/z aparece na corrida cromatográfica. Neste caso específico, é possível determinar, de fato, qual íon molecular é responsável pela absorção do pico do cromatograma com atividade positiva no EPEL. A sobreposição exata de um determinado sinal do EIC com o pico cromatográfico de interesse indica que tal íon é realmente o responsável pela absorção observada.

Partindo desse raciocínio, foi possível “filtrar” os íons candidatos a ser o precursor da luciferina. Na figura 24, foram observados cerca de 20 íons moleculares com m/z diferentes no pico cromatográfico com atividade positiva no EPEL. Porém somente 4 íons moleculares (m/z 247,0622; 349,1307; 371,1128 e 457,1167) apresentavam sobreposição exata ao pico cromatográfico de interesse (Figura 25).

Figura 25: Correlação entre os cromatogramas com absorção em 320 nm e 365 nm e os EIC's no modo positivo de ionização. A figura A) demonstra um exemplo de sobreposição exata do EIC com o pico cromatográfico (*) com atividade positiva no EPEL. A figura B) demonstra um exemplo de não sobreposição do EIC com o pico cromatográfico (*) com atividade positiva no EPEL.

Apesar dos candidatos ao precursor da luciferina fúngica terem diminuído consideravelmente, ainda não era possível saber ao certo qual íon era correspondente a molécula de interesse. Assim sendo, o experimento foi

repetido de forma análoga ao descrito anteriormente, porém agora no modo negativo de ionização (Figura 26).

Figura 26: Espectro de massas obtido do pico do cromatograma com atividade positiva no EPEL, no modo negativo de ionização.

Ao realizar a mesma operação para os íons obtidos através do modo negativo de ionização, foi observado novamente que diversos íons moleculares com m/z diferentes estavam presentes no pico do cromatograma com atividade positiva no EPEL. Porém, apenas os íons m/z 245,0601; 347,1244; 369,1119 e 429,1005 apresentavam sobreposição exata ao pico cromatográfico de interesse (Figura 27).

Figura 27: Exemplo de sobreposição exata entre os cromatogramas com absorção em 320 nm e 365 nm e o EIC de m/z 245,0601 no modo negativo de ionização. O pico cromatográfico destacado com (*) apresentava atividade positiva no EPEL.

Ao comparar os íons candidatos ao precursor da luciferina obtidos do modo positivo (M^+) e negativo (M^-) de ionização, observou-se a recorrência de 3 moléculas com massas moleculares distintas. Os íons com m/z 247,0622; 349,1307 e 371,1128 (M^+) e de m/z 245,0601; 347,1244 e 369,1119 (M^-) são equivalentes a compostos de massa molecular iguais a 246,0546 u, 348,1234 u e 370,1055 u, respectivamente. Não se sabe ao certo o motivo dos demais candidatos ao precursor da luciferina não terem aparecido nos dois espectros de massas obtidos. Quando as figuras 24 e 26 são comparadas, claramente é observado o (des)aparecimento de diversos íons moleculares, o que de certa forma não era esperado, pois foi injetado o mesmo extrato quente concentrado em ambos experimentos. Tal fato pode ser explicado tentativamente pela presença de cátions de amônio quaternários, os quais não são ionizados no modo negativo, e conseqüentemente, não são detectados. Também é razoável afirmar que ocorreram reações e/ou degradação de moléculas no extrato, fato que acarretou nas mudanças observadas nos espectros de massas.

Em seguida, foi realizada uma corrida cromatográfica idêntica a anterior, só que desta vez foi utilizado um novo extrato quente concentrado, injetado imediatamente após o seu preparo. Foi observado que, dos íons moleculares candidatos ao precursor da luciferina (m/z 245,0601; 347,1244 e 369,1119) apenas o íon com m/z 245 (m/z 245,0440 no caso deste experimento) foi observado, como mostra a figura 28, no pico cromatográfico com atividade positiva no EPEL.

Figura 28: Espectro de massas obtido do pico do cromatograma com atividade positiva no EPEL, no modo negativo de ionização.

Baseado no espectro de massas da figura 28 foi possível supor que o íon de m/z 245,0440 era o íon molecular correspondente ao precursor da luciferina fúngica. Para corroborar esta hipótese, experimentos foram realizados variando tanto as condições cromatográficas, quanto as colunas utilizadas. Neste ponto, é importante citar que, devido a problemas de calibração do espectrômetro de massas, o grau de exatidão dos m/z obtidos era de $\pm 0,05$. Por este motivo, será observada uma diferença nos valores de m/z adquiridos.

Ao utilizar condições cromatográficas e colunas diferentes, era esperado que, se a hipótese de que o íon de m/z $245,04 \pm 0,05$ correspondesse ao precursor da luciferina fúngica estivesse correta, o EPEL sempre seria positivo quando uma fração que tivesse esse íon molecular fosse coletada e testada. Inicialmente, a coluna Luna C₁₈ (2) foi mantida para os experimentos, alterando-se somente as condições cromatográficas, conforme anteriormente descrito no item 3.7.3.1.2. Ao longo da corrida, foi monitorada a presença de um íon com m/z $245,04 \pm 0,05$ (Figura 29), no modo negativo de ionização.

Figura 29: Correlação entre os cromatogramas com absorção em 320 nm e 365 nm e o EIC de m/z 245,0466. O pico cromatográfico destacado com (*) apresentava atividade positiva no EPEL.

Ao fim da corrida cromatográfica, observou-se que um íon molecular de m/z 245,0466 era eluído com tempo de retenção de 26 min. O experimento foi realizado novamente de forma idêntica, só que desta vez foi recolhida uma fração no tempo de retenção do íon molecular em questão. Verificou-se que o EPEL tinha atividade positiva. Deste modo, a fim de obter mais evidências de que o composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u realmente se tratava da luciferina fúngica, foram realizadas injeções no HPLC acoplado a um espectrômetro de massas variando as condições cromatográficas e a fases estacionárias. Ao fim dos experimentos, foi possível correlacionar a presença do composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u com a atividade positiva do EPEL em todas as condições cromatográficas citadas na tabela 1.

Tabela 1. Correlação entre o composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u e a atividade no EPEL em diferentes colunas e condições cromatográficas.

Fase estacionária	Condição cromatográfica	Tempo de retenção	<i>m/z</i> (composto majoritário)	EPEL
Luna C ₁₈ (2) Phenomenex	27% de MeOH	83,5 min	247,0621 (M+)	Positivo
Luna C ₁₈ (2) Phenomenex	30-45% de MeOH em 45 min	26,0 min	245,0460 (M-)	Positivo
Synergi Polar-RP Phenomenex	20-60% de MeOH em 30 min	27,7 min	245,0573 (M-)	Positivo
Synergi Polar-RP Phenomenex	30-60% de MeOH em 30 min	23,6 min	245,0578 (M-)	Positivo
Synergi Max-RP Phenomenex	30-45% de MeOH em 30 min	20,6 min	245,0500 (M-)	Positivo
Synergi Max-RP Phenomenex	30-45% de MeOH em 45 min	33,5 min	245,0582 (M-)	Positivo
Synergi Max-RP Phenomenex	30-60% de MeOH em 30 min	20,8 min	245,0566 (M-)	Positivo
Synergi Max-RP Phenomenex	30-60% de MeOH em 45min	25,7 min	245,0594 (M-)	Positivo
Acclaim [®] Mixed Mode HILIC-1 Dionex	30-45% de MeOH em 45 min	24,5 min	245,0485 (M-)	Positivo

A presença do íon molecular de um composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u estar sempre associada com a atividade positiva no EPEL era um forte indício de que este composto poderia ser o precursor da luciferina fúngica. Ressalta-se que, além de serem utilizadas colunas de HPLC com seletividades distintas, a única referência utilizada para coletar as frações com atividade positiva no EPEL foi o monitoramento da presença desse íon.

Uma vez que este íon molecular tem *m/z* 245,046881 (M-), é possível propor as seguintes fórmulas moleculares correspondentes ao íon molecular de interesse (Tabela 2).

Tabela 2. Prováveis fórmulas moleculares, assim como seus respectivos m/z 's no modo negativo de ionização. São mostrados também as fórmulas e massa moleculares dos compostos equivalentes.

Possível Fórmula molecular	m/z (M-)	Fórmula molecular equivalente	Massa molecular equivalente
$C_{13}H_9O_5$	245,045547	$C_{13}H_{10}O_5$	246,052824
$C_{14}H_5N_4O$	245,046884	$C_{14}H_6N_4O$	246,054161
$C_{13}H_{10}ClN_2O$	245,048714	$C_{13}H_{11}ClN_2O$	246,055991
$C_{14}H_{10}KN_2$	245,048654	$C_{14}H_{11}KN_2$	246,055931

Em relação à seletividade das fases estacionárias utilizadas, as colunas Luna C_{18} (2) e Synergi Max-RP possuem uma seletividade relativamente semelhante, onde em ambas há uma maior interação de compostos apolares/hidrofóbicos com a fase estacionária. Já na coluna Synergi Polar-RP, a sua fase estacionária possui uma maior interação com compostos polares e aromáticos. Na coluna Acclaim® Mixed Mode HILIC-1, a sua fase estacionária (híbrida) permite uma maior interação tanto com compostos polares e apolares (dados obtidos através dos manuais dos fabricantes).

A fim de buscar mais evidências para corroborar a hipótese de que o composto em questão realmente seria o precursor da luciferina fúngica, foi realizado um experimento monitorando a degradação do precursor da luciferina no HPLC acoplado a um espectrômetro de massas. Este experimento consistia, basicamente, em deixar um extrato quente concentrado sob condições que degradassem a molécula de interesse (condições essas descritas na introdução). Então, um novo extrato quente concentrado foi preparado, e uma alíquota foi injetada imediatamente no equipamento. A fração que continha o íon molecular em questão foi recolhida e sua atividade foi testada através do EPEL.

Porém, ao invés borbulhar N₂ gasoso, lacrar e colocar o extrato sob banho de gelo e ao abrigo de luz, o mesmo foi colocado em um Eppendorf e deixado com a tampa aberta sob a bancada do laboratório durante 18 horas. Uma alíquota foi retirada após 4 horas, e a outra, após 18 horas. Ambas as alíquotas foram injetadas e tiveram a atividade frente ao EPEL testadas.

Figura 30: Intensidade do sinal do EIC de m/z 245,0518 ao longo do tempo. Foi utilizada uma coluna Synergi Max-RP Phenomenex, com 30-45% de metanol em 45 min.

Constatou-se que, além da intensidade do sinal EIC de m/z 245,0518 diminuir ao longo do tempo, a intensidade de emissão de luz no EPEL das alíquotas recolhidas diminuía conforme maior o tempo que o extrato permanecia em cima da bancada. Mais uma vez, foi obtida uma clara evidência de que o composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u em questão era o precursor da luciferina fúngica.

Diante de tais resultados, foi idealizado um experimento o qual confirmaria de uma vez por todas a hipótese de que um composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u seria a luciferina fúngica. Em 2012, foi demonstrado que os substratos, assim como as enzimas, eram os mesmos para as quatro linhagens de fungos bioluminescentes conhecidas (Oliveira *et al.* 2012). Deste modo, se a hipótese proposta fosse realmente verdadeira, o íon molecular correspondente

ao composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u estaria presente em um extrato quente preparado a partir de qualquer espécie de fungo bioluminescente e teria atividade positiva frente ao EPEL.

Assim, foram preparados extratos quentes a partir de micélios do fungo *Gerronema viridilucens*. Optou-se por realizar este tipo de extração (descrito no item 3.3.2.), pois as culturas já estavam sendo cultivadas no laboratório e, para utilizar corpos de frutificação do fungo citado anteriormente, o mesmo ainda teria que ser coletado. Vale lembrar também que os experimentos estavam sendo realizados em uma época do ano que não era a ideal para realizar a coleta dos corpos de frutificação, devido a sua sazonalidade. Então, o método de extração foi validado em culturas do fungo *N. gardneri* (Figura 31), pois, como já era de conhecimento, emitiam uma maior intensidade de luz e conseqüentemente, possuíam uma maior quantidade do precursor da luciferina quando comparado a culturas do fungo *G. viridilucens*.

Figura 31: Curvas de emissão de luz obtidas com o EPEL utilizando tampão de extração de enzimas (branco) e um extrato quente obtido através da extração no tubo potter de micélios do fungo *N. gardneri*.

Na figura 31, observa-se que há emissão de luz no branco realizado, constatando a presença do precursor luciferina no extrato frio. Porém, a mesma não se encontra em quantidade suficiente para interferir na realização do EPEL. Como é observada uma atividade positiva no EPEL, pode-se dizer que o método de extração do precursor da luciferina a partir de micélios do fungo *N. gardneri* é válido, pois é observada uma maior intensidade de emissão de luz ao utilizar o extrato quente preparado, ou seja, o precursor da luciferina está presente no extrato quente. Entretanto, ao realizar o mesmo procedimento com os micélios do fungo *G. viridilucens*, não foi observado nenhum aumento de emissão de luz, apesar de terem sido usadas quantidades relativamente altas de micélios para preparar o extrato (é necessário cultivar aproximadamente 40 placas de Petri para obter 5g de micélio do fungo *G. viridilucens*). Como o procedimento utilizado foi realizado com sucesso utilizando micélios do fungo *N. gardneri*, conclui-se que os extratos não possuíam uma concentração do precursor da luciferina suficientemente alta para que fosse observada uma maior intensidade de emissão de luz, sendo necessário ou trabalhar com uma quantidade maior de micélios, ou trabalhar com corpos de frutificação do fungo *G. viridilucens* ou de qualquer outro fungo bioluminescente. As culturas dos fungos bioluminescentes *Mycena luxaeterna* e *Mycena lucentipes* não foram utilizadas nestes experimentos, pois a intensidade de emissão de luz das mesmas era muito baixa, e logo, assumia-se que as mesmas teriam uma quantidade do precursor luciferina igual ou até menor do que a do fungo *G. viridilucens*.

Paralelamente aos experimentos no HPLC acoplado ao espectrômetro de massas, uma tentativa de realizar um “clean-up” no extrato quente concentrado foi elaborada e testada, utilizando cartuchos de SPE de C₁₈. O objetivo deste

experimento era injetar um extrato mais “limpo” em um HPLC, sendo possível, além de realizar uma purificação mais efetiva da molécula de interesse, economizar tempo e solventes. Das frações recolhidas (0, 20, 40, 60 e 80% de metanol), apenas a fração com 40% de metanol em solução apresentou atividade positiva frente ao EPEL. As frações obtidas foram injetadas em um HPLC, como mostra a figura 32. Foi utilizado um HPLC idêntico ao utilizado nos experimentos anteriores, porém o mesmo não era acoplado a um espectrômetro de massa. As condições da corrida estão descritas no item 3.7.3.1.2.

Figura 32: Cromatogramas obtidos através da injeção de alíquotas das frações provenientes da purificação por SPE.

Foi constatado que, na fração coletada utilizando 40% de metanol em solução, um pico cromatográfico eluído no tempo de 26 minutos apresentava

atividade positiva no EPEL, conforme fora indicado na tabela 1. Observa-se que, de fato, foi realizada uma purificação eficiente no extrato quente concentrado, já que boa parte dos picos cromatográficos que apareciam no intervalo de tempo de 0 a 20 min não estão presentes na fração com 40% de metanol em solução. É possível tornar esta purificação ainda mais efetiva aumentando o volume das soluções com diferentes porcentagens de metanol utilizadas (ao invés de utilizar 2 mL de soluções 0, 20, 40, 60 e 80% de metanol, pode-se utilizar soluções com 5 mL ou até mesmo 10 mL), e também utilizando mais soluções de diferentes porcentagens de metanol (0, 10, 20, 30, 40 e 50% de metanol).

A fração coletada utilizando 40% de metanol em solução foi concentrada, utilizando os procedimentos descritos nos itens 3.4.2 e 3.5, e re-injetada no HPLC, utilizando uma coluna Luna C₁₈, 250 x 4,6 mm (Phenomenex), com fluxo de 1,0 mL/min, e uma fase móvel composta por água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (v/v)). O gradiente utilizado era composto por metanol variando de 30% até 45%, no intervalo de 0 a 45 minutos, com detecção no UV/VIS em 320 nm e 365 nm. Foi possível obter o espectro de absorção do pico cromatográfico com atividade positiva no EPEL, como mostra a figura 33.

Figura 33: Espectro de absorção obtido através da injeção da fração concentrada em um HPLC equipado com arranjo de diodos. Fase estacionária: Luna C₁₈, 250 x 4,6 mm; Fase móvel: água/metanol (A/B, com A contendo 0,025% de HCOOH (%v/v)), em um gradiente variando B de 30-45% no intervalo de 0-45 minutos; Detecção no UV/VIS: 320 nm e 365 nm.

A tentativa bem sucedida deste experimento seria de extrema importância para a purificação do precursor da luciferina fúngica. Ao se injetar um extrato sem os picos cromatográficos observados, no intervalo de tempo em questão, há a possibilidade de desenvolver corridas cromatográficas que melhorassem a purificação do precursor da luciferina. Por exemplo, seria possível aumentar a porcentagem inicial de metanol utilizada, fazendo com que o precursor da luciferina fosse eluído com um menor tempo de corrida. E caso ele não estivesse devidamente purificado, seria possível estabelecer um gradiente com uma baixa variação da porcentagem de metanol para que o precursor da luciferina fosse devidamente purificado, sem que o tempo total de corrida cromatográfica fosse muito elevado, evitando assim a degradação do mesmo durante o seu processo de purificação.

4.6. Elucidação da estrutura molecular do precursor da luciferina e da luciferina fúngica

Em 2015, Purto e colaboradores relataram (Purto *et al.* 2015) a estrutura molecular do precursor da luciferina e da luciferina fúngica. Foi evidenciado que, de fato, o precursor da luciferina fúngica era uma molécula com massa exata 246,05 u, correspondente a uma molécula de hispidina, de fórmula molecular $C_{13}H_{10}O_5$, dados estes descritos no item anterior (Tabela 2).

Após a publicação deste trabalho, foi realizado um contato com o Prof. Ilia Yampolsky, quando foi proposta uma parceria entre os grupos de pesquisa, a qual foi prontamente aceita pelo Prof. Yampolsky. Foi estabelecido que o grupo de pesquisa do Prof. Yampolsky enviaria para o nosso grupo de pesquisa a luciferina e a suposta oxiluciferina de fungos para o estudo do mecanismo em questão, que seria realizado ao mesmo tempo por ambos grupos de pesquisa.

4.7. Estudos com a hispidina

Foram adquiridos da Sigma-Aldrich 5 mg de hispidina. A necessidade de trabalhar com pequenas quantidades de material fez com que a mesma fosse fracionada, conforme descrito no item 3.8., já que a mesma é sensível à luz e ao oxigênio. Inicialmente, foi realizado um EPEL, onde foram utilizados 50 μ L de uma solução 3,8 μ M de hispidina como fonte de substrato para a reação. O EPEL foi realizado para que fosse possível confirmar se a hispidina iria reagir com a hidroxilase e a luciferase extraídas a partir dos micélios do fungo bioluminescente *N. gardneri*, e também para observar a emissão de luz.

Figura 34: Curva de emissão de luz obtida ao realizar o EPEL utilizando o extrato frio (hidroxilase/luciferase) e uma solução de hispidina (concentração final = 0,54 μM).

Como mostra a figura 34, a hispidina reage com as enzimas extraídas do micélio do fungo bioluminescente *N. gardneri*, uma vez que o EPEL possui uma atividade positiva. Desse modo, afirma-se novamente que todas as espécies de fungos bioluminescentes compartilham um mecanismo de emissão de luz em comum. Também foram obtidos os espectros de absorção, massas, emissão e excitação da hispidina (Figuras 35 e 36).

Figura 35: Espectros de absorção (superior) e de massas (inferior) da hispidina obtidos no HPLC/MS.

É possível observar na figura 35 que o espectro de absorção da hispidina é semelhante ao mostrado na figura 33, e que o espectro de massas mostra um íon molecular (modo negativo) com o mesmo m/z (considerando a margem de erro) do descrito na tabela 1, indicando mais uma vez que a molécula que estava sendo purificada realmente era a hispidina.

Figura 36: Espectros de emissão (λ_{exc} 360 nm; vermelho) e de excitação (preto; λ_{em} 490 nm) da hispidina.

Já em relação a figura 36, é possível observar que a hispidina tem uma emissão em aproximadamente 490 nm, diferente do observado em corpos de frutificação/micélios de fungos bioluminescentes (530 nm). Isso ocorre porque a molécula responsável pela emissão de luz em fungos bioluminescentes não é a hispidina, e sim a oxiluciferina, produto da reação luciferina/luciferase.

A preferência pela utilização da espectroscopia de massas ao invés da técnica de fluorescência para a purificação do precursor da luciferina fúngica pode ser justificada por dois motivos. O primeiro era o fato de que não havia sido obtida quantidade da molécula purificada o suficiente para que fosse possível determinar o comprimento de onda para o espectro de emissão/excitação. O segundo motivo era o fato de inúmeros compostos presentes nos corpos de frutificação do fungo *N. gardneri* apresentarem o mesmo comprimento de onda de emissão da hispidina, sendo impossível identificar qual seria correspondente a hispidina (figuras 37 e 38).

Figura 37: Cromatograma obtido após a injeção do extrato quente proveniente dos corpos de frutificação do fungo *N. gardneri* no HPLC, analisado pela fluorescência em 490 nm e excitando-se em 360 nm.

Figura 38: Cromatograma obtido após a injeção de uma solução de hispidina (3,8 μ M) no HPLC, analisado pela fluorescência em 490 nm e excitando-se em 360 nm.

4.8. Espectros de fluorescência e determinação do rendimento quântico de fluorescência da possível oxiluciferina

Os espectros de absorção e de fluorescência (λ_{exc} 460 nm) de uma solução da oxiluciferina (dissolvida em acetona) e fluoresceína (dissolvida em uma solução 0,1 M de NaOH, pH 11) estão expostos na figura 39. Como não é necessário determinar as concentrações das soluções para determinar o rendimento quântico de fluorescência, não se teve a preocupação de realizar estas medidas. A fluoresceína foi utilizada como padrão, uma vez que seu rendimento quântico de fluorescência foi determinado de forma confiável (Würth *et al.* 2011). O comprimento de onda selecionado para registrar os espectros de emissão de ambos os compostos foi baseado nos espectros de absorção deles, sendo que o valor de λ foi selecionado em uma região onde os dois compostos absorvem luz, com um valor abaixo de 0,05, conforme o procedimento padrão utilizado em fotoquímica (Würth *et al.* 2013). Ambos compostos devem ser excitados no mesmo comprimento de onda (460nm).

Figura 39: Espectros de absorção e de emissão (λ_{exc} 460 nm) obtidos da oxiluciferina (OxyLn) e da fluoresceína. A intensidade do espectro de emissão da oxiluciferina está multiplicado 50 vezes.

Para calcular o rendimento quântico de fluorescência da oxiluciferina, foi utilizada a fórmula descrita na equação 1 (Silva *et al.* 2002), onde Φ_{FL} é o rendimento quântico de fluorescência, Área é o valor da integral obtida dos gráficos de fluorescência, Abs é o valor da absorbância em 460 nm e n é o valor do índice de refração da luz do solvente utilizado para cada um dos compostos, fluoresceína e oxiluciferina.

$$\Phi_{FL} = \frac{\text{Área}_{FL,oxiluciferina}}{\text{Área}_{FL,fluoresceína}} \times \frac{\text{Abs}_{460nm,fluoresceína}}{\text{Abs}_{460nm,oxiluciferina}} \times \Phi_{FL,fluoresceína} \times \left(\frac{n_{\text{água}}}{n_{\text{acetona}}} \right)^2$$

Equação 1

O valor obtido do rendimento quântico de fluorescência para a possível oxiluciferina foi de 1,1%. O mesmo valor também foi obtido pelo grupo de pesquisa do o Prof. Ilia Yampolsky, fato esse que corrobora o valor obtido.

É importante citar também que a possível oxiluciferina não apresenta fluorescência quando dissolvida em água, ou em tampão fosfato (20 mM; pH 6, 7 ou 8). A molécula em questão somente apresenta fluorescência quando dissolvida em acetona, o que pode ser um indício de que o sítio ativo da luciferase seja hidrofóbico. Experimentos adicionais estão sendo realizados pelo grupo de pesquisa para comprovar essa hipótese.

4.9. Estudo cinético da reação luciferina/luciferase

Para que fosse possível determinar alguns dados em relação à cinética da reação luciferina/luciferase, o ensaio padrão quimiluminescente foi realizado variando alguns parâmetros do mesmo, conforme descrito no item 3.11. Inicialmente, ao contrário do que se esperava, foram encontradas algumas dificuldades para padronizar o ensaio, uma vez que não eram obtidos resultados reprodutíveis ao medir a emissão de luz da reação. Apesar de não ser citado

anteriormente no procedimento experimental, nos primeiros experimentos realizados para desenvolver o ensaio, foi utilizada uma fração do extrato frio rica em luciferase sem a adição de albumina. Diante dos resultados negativos, optou-se por tentar solubilizar a luciferase com dodecil-maltosidade (DDM), procedimento este utilizado pelos colegas de laboratório. Novamente não foi possível obter resultados reprodutíveis ao medir a emissão de luz da reação. Somente foi possível obter resultados reprodutíveis quando era utilizada uma fração do extrato frio rica em luciferase com a adição de albumina (1mg/mL), sendo que a solução estava sob agitação moderada.

Feito isso, foram realizados ensaios padrão bioluminescentes com diferentes parâmetros, conforme descrito no item 3.11. Os gráficos de emissão de luz obtidos são mostrados na figura 40.

Figura 40: Dependência da intensidade de quimiluminescência da reação luciferina-luciferase com a concentração de luciferina (76-760 nM) e tampão fosfato pH 6-8. Experimentos em duplicata a 25°C.

É possível observar na figura 40 que a intensidade emissão de luz é diretamente proporcional à concentração de 3-hidróxi-hispidina. Também é possível dizer que a emissão de luz é maior quando o pH da solução é mais elevado. Neste caso específico, pode-se dizer que a intensidade máxima de emissão de luz deve-se ao pH ótimo da enzima ou depende da facilidade que um próton é abstraído da 3-hidróxi-hispidina (Esquema 9, o mecanismo da reação será devidamente discutido no item 3.9).

Os decaimentos monoexponenciais de luz observados na figura 40 foram analisados com o programa de computador Origin Pro 8.5.0 SR1, com a equação $y = Ae^{(-kx)}$. Os dados do ajuste do fator pré-exponencial (A) e da constante observada de decaimento (k_{obs}) foram utilizados para produzir um gráfico para cada curva de decaimento até zero de intensidade, de 0 a 10.000 s. As curvas assim produzidas tiveram a quantidade total de luz em 10.000 s integrada (Q) (Tabela 3).

Tabela 3. Dados obtidos das curvas de emissão de luz após a análise no Origin.

n (pmol)	[luciferina] (nM)	pH 6 $k_{obs} = (1,5 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	pH 7 $k_{obs} = (1,0 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	pH 8 $k_{obs} = (1,0 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
		Q (counts)	Q (counts)	Q (counts)
15,2	76	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^8$	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^9$	$(3,8 \pm 0,9) \times 10^9$
30,4	152	$(7 \pm 2) \times 10^8$	$(4,2 \pm 0,5) \times 10^9$	$(6 \pm 1) \times 10^9$
60,8	304	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^9$	$(6,3 \pm 0,5) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{10}$
76	380	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^9$	$(6,0 \pm 0,5) \times 10^9$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{10}$
152	760	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^9$	$(14 \pm 1) \times 10^{10}$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{10}$

É possível afirmar, baseado dos dados mostrados na tabela 3, que a cinética da reação é a praticamente a mesma em todas as condições, uma vez que os valores da constante de decaimento da reação não apresentam uma variação pronunciada, independente dos parâmetros utilizados. O que é

compatível com reação de pseudo-primeira ordem em relação à concentração da luciferase, uma vez que o substrato está em excesso em todos os valores de pH.

4.10. Determinação do rendimento quântico de quimiluminescência e rendimento quântico singlete da reação luciferina/luciferase

Para calcular o rendimento quântico de quimiluminescência da reação luciferina/luciferase foi utilizada a fórmula descrita na equação 2 (Silva *et al.* 2002), onde Φ_{CL} é o rendimento quântico de quimiluminescência da reação luciferina/luciferase, Q é o valor da integral obtida dos gráficos de emissão de luz extrapolados até 10^4 segundos (Tabela 3), $f_{luminol}$ é o fator de correção da reação de quimiluminescência do luminol $[(4,4 \pm 0,3) \times 10^{-23} \text{ E/counts}]$, f_{sf} é o fator de correção da sensibilidade da fotomultiplicadora (1,17) e n é número de mols de 3-hidróxi-hispidina.

$$\Phi_{CL} = \frac{Q f_{luminol} f_{sf}}{n}$$

Equação 2

A utilização do fator de correção da reação de quimiluminescência do luminol ($f_{luminol}$) é necessária, pois esta reação é utilizada como padrão de emissão de fóton (Lee *et al.* 1965). Para determinar o valor de $f_{luminol}$, foi utilizado procedimento descrito por Stevani e colaboradores, porém com algumas modificações (Stevani *et al.* 2000). O procedimento consiste em adicionar, em um tubo de ensaio, 100 μL de H_2O_2 (0,1 mM, 0,0003%) e 100 μL de uma solução de hemina dissolvida em um tampão fosfato (20 mM, pH 7). A solução de hemina deve apresentar valor de absorbância igual a 0,1 em 414 nm. A emissão de luz começou a ser registrada logo após a adição da solução de hemina. Foi

observada uma rápida e intensa emissão de luz, como mostra a figura 41. Quando a intensidade de luz decaiu até o valor da linha base do equipamento (200 counts, 90 s), 300 μ L de solução 1,0 nM de luminol ($\epsilon = 7.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 347 nm) foram adicionados ao meio reacional, e a emissão de luz da reação continuou a ser registrada até 360 s.

Figura 41: Reação de quimiluminescência do luminol utilizada para a calibração do luminômetro (100 μ L de H_2O_2 e 100 μ L de uma solução de hemina dissolvida em um tampão fosfato. Após 90 s, 300 μ L de solução 1,0 nM de luminol foram adicionados ao meio reacional). A reação foi feita em triplicata.

Finalmente, foi utilizada a fórmula descrita na equação 3, onde Φ_{CL} é o rendimento quântico de quimiluminescência do luminol ($\Phi_{\text{CL,luminol}} = 0,0114 \pm 0,0006 \text{ Emol}^{-1}$, Lee *et al.* 1965), Q é o valor da integral obtida da intensidade de emissão de luz da reação de quimiluminescência do luminol, e n_{luminol} é o número de mols de luminol.

$$f_{\text{luminol}} = \frac{\Phi_{\text{CL,luminol}} \times n_{\text{luminol}}}{Q_{\text{luminol}}}$$

Equação 3

A utilização do fator de correção da sensibilidade do tubo fotomultiplicador do luminômetro (f_{sf}) é necessária, pois o fotocatodo do tubo fotomultiplicador do luminômetro possui sensibilidade diferente para cada comprimento de onda, sendo ele mais sensível nos comprimentos de onda entre 440 nm e 480 nm, como mostra a figura 42 (dado fornecido pela Berthold DS, fabricante do equipamento). O valor do f_{sf} foi determinado com base na curva de sensibilidade do seu fotocatodo para comprimentos de onda entre 320 nm a 610 nm (figura 42). Não é necessário utilizar o fator de correção para a reação de quimiluminescência do luminol, uma vez que emissão máxima de luz da reação é em 445 nm, portanto, segundo a figura 42, o fator de correção da sensibilidade da fotomultiplicadora seria igual a 1. Já em relação a reação luciferina/luciferase, baseado na emissão máxima de fluorescência da oxiluciferina (530 nm, figura 39), o fator de correção da sensibilidade da fotomultiplicadora seria igual a 1,17, uma vez que nessa região a sensibilidade do fotocatodo é de aproximadamente 83%.

Figura 42: Curva de resposta espectral do fotocatodo fornecida pela empresa fabricante do luminômetro utilizado, Berthold DS. Fotomultiplicadora tipo 9107.

Para calcular o rendimento quântico singlete (Φ_s) da reação luciferina/luciferase foi utilizada a fórmula descrita na equação 4 (Silva *et al.* 2002), onde Φ_{CL} é o rendimento quântico de quimiluminescência da reação luciferina/luciferase e $\Phi_{FLoxiluciferina}$ é o rendimento quântico de fluorescência da oxiluciferina (1,1%, como descrito no item 5.8).

$$\Phi_s = \frac{\Phi_{CL}}{\Phi_{FLoxiluciferina}}$$

Equação 4

Os valores obtidos dos rendimentos quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) e dos rendimentos quântico singlete (Φ_s) da reação luciferina/luciferase estão expostos na tabela 4. O valor médio obtido de todos os rendimentos quânticos em todas as concentrações utilizadas, para cada pH, estão descritos na tabela 5.

Tabela 4. Valores obtidos dos rendimentos quântico de quimiluminescência (Φ_{CL}) e dos rendimentos quântico singlete (Φ_s) da reação luciferina/luciferase.

n (pmol)	[luciferina] (nM)	pH 6		pH 7		pH 8	
		Φ_{CL} (%)	Φ_s (%)	Φ_{CL} (%)	Φ_s (%)	Φ_{CL} (%)	Φ_s (%)
15,2	76	0,11 ± 0,01	10 ± 1	0,7 ± 0,2	63 ± 14	1,3 ± 0,3	117 ± 30
30,4	152	0,11 ± 0,03	10 ± 3	0,7 ± 0,1	65 ± 9	0,9 ± 0,2	86 ± 21
60,8	304	0,12 ± 0,03	11 ± 3	0,5 ± 0,1	48 ± 5	0,9 ± 0,1	79 ± 5
76	380	0,077 ± 0,004	7,0 ± 0,4	0,41 ± 0,04	37 ± 4	0,8 ± 0,1	69 ± 5
152	760	0,07 ± 0,01	6 ± 1	0,5 ± 0,1	42 ± 5	0,56 ± 0,04	51 ± 4

Tabela 5. Valores médios obtidos de todos os rendimentos em todas as concentrações utilizadas, para cada pH.

pH	Φ_{CL} (%)	Φ_s (%)
6	0,10 ± 0,02	9 ± 2
7	0,6 ± 0,1	51 ± 10
8	0,9 ± 0,2	80 ± 17

É possível afirmar, com base nos resultados obtidos, que os rendimentos aumentam com o aumento do valor de pH e que é observada variação pronunciada nos valores de rendimento quântico. Porém, as constantes observadas de decaimento são as mesmas (k_{obs} , Tabela 3), o que seria de se esperar de uma reação de pseudo-primeira ordem em relação a concentração de enzima, que não varia. Novamente, pode-se dizer que há o aumento dos valores de rendimento quântico com o aumento do valor do pH se deve ao pH ótimo da enzima (Esquema 5, o mecanismo da reação será devidamente discutido no próximo item).

4.11. Estudo do mecanismo da reação luciferina/luciferase

Para que seja possível determinar o mecanismo de uma reação química, é necessário conhecer o(s) produto(s)/subproduto(s) da reação. No caso da reação de emissão de luz em fungos bioluminescentes, o produto responsável pela luminescência da reação é a oxiluciferina. O grupo de pesquisa do Prof. Ilia Yampolsky obteve indícios de que a molécula representada na figura 8 era um produto formado na reação luciferina/luciferase, que apresentava fluorescência em torno de 530 nm, mesmo comprimento de onda da emissão de luz em fungos bioluminescentes, fazendo com que a molécula se tornasse uma forte candidata a oxiluciferina. Para verificar se estas evidências eram verdadeiras, foram realizados diversos experimentos a fim de observar a formação da molécula em questão, e também a formação de outros produtos/subprodutos. Inicialmente, foram injetados os padrões da 3-hidróxi-hispidina e da possível oxiluciferina, conforme descrito no item 3.14.1.

Figura 43: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z 's equivalentes a 3-hidróxi-hispidina (preto) e a possível oxiluciferina (vermelho).

Como mostra a figura 43, é possível perceber que a possível oxiluciferina (M-, EIC m/z 249,05 $\pm$ 0,05) apresenta tempo de retenção maior do que a 3-hidróxi-hispidina (M-, EIC m/z 261,05 $\pm$ 0,05). No espectro de massas obtido do sinal de EIC equivalente a 3-hidróxi-hispidina (Figura 44), além do sinal correspondente a molécula (m/z 261,0399), também foram observados outros sinais de m/z . Um dos sinais (m/z 231,0298) tinha intensidade maior que o da 3-hidróxi-hispidina, e outros sinais com intensidade considerável, inclusive sinal com m/z 249,0409, com m/z equivalente a possível oxiluciferina. A presença desses sinais pode ser explicada devido a possíveis reações da 3-hidróxi-hispidina que ocorrem na fonte de spray de elétrons ou no próprio detector do aparelho, já que a mesma é extremamente instável (Purtov *et al.* 2015). No caso específico do sinal com m/z 249,0409, a presença dele pode ser justificada devido a oxidação da 3-hidróxi-hispidina no aparelho, resultando na possível oxiluciferina. Por possuírem tempos de retenção distintos, não haveria problemas em distinguir qual sinal de EIC é correspondente a formação da possível oxiluciferina via reação luciferina/luciferase ou a formação da possível

oxiluciferina no detector do aparelho de MS. Não foi possível atribuir reações e/ou estruturas para demais sinal de m/z observados. No espectro de massas obtido do sinal de EIC equivalente a possível oxiluciferina (Figura 45), apenas o íon molecular correspondente a molécula é observado, com intensidade considerável.

Figura 44: Espectro de massas obtido do sinal de EIC equivalente a 3-hidróxi-hispidina e a possível oxiluciferina (inferior).

Figura 45: Espectro de massas obtido do sinal de EIC equivalente a possível oxiluciferina.

Em seguida, foi realizado o ensaio quimiluminescente padrão, com o objetivo de verificar a formação do produto da reação. Inicialmente, foram injetadas alíquotas retiradas diretamente do ensaio padrão quimiluminescente, conforme descrito no item 3.14.2.1. Após a análise dos cromatogramas de EIC's obtidos, não foi possível observar a presença de sinais correspondentes a 3-hidróxi-hispidina e a possível oxiluciferina. Para tentar resolver o problema, foi realizado um novo ensaio quimiluminescente padrão, utilizando agora solução

10 vezes mais concentrada de 3-hidróxi-hispidina (concentração no tubo de ensaio de 3,8 μM). Desta vez, ao injetar a alíquota retirada no início da reação, foi possível detectar sinal de EIC (m/z 261,05 $\pm$ 0,05) com tempo de retenção de 10 min. Todavia, o mesmo possuía intensidade muito baixa, conforme mostra a figura 46.

Figura 46: Cromatograma obtido de EIC com m/z equivalente a possível oxiluciferina.

Para que fosse possível observar sinais com maior intensidade, foi realizada a concentração das alíquotas retiradas do meio reacional através da utilização de filtros de corte molecular, conforme descrito no item 3.14.2.2. Ao utilizar os filtros, as enzimas presentes da fração do extrato frio rica em luciferase ficariam retidas nas membranas do filtro, e apenas as moléculas orgânicas passariam pela membrana, concentrando assim as alíquotas. Após injetar as alíquotas provenientes da filtração, foi constatado novamente que as mesmas não estavam suficientemente concentradas para que fosse possível observar a formação dos produtos da reação luciferina/luciferase, pois não foi detectado nenhum sinal de EIC com intensidade suficientemente alta para que qualquer tipo de análise fosse realizada de forma confiável, como mostra a figura 47.

Figura 47: Cromatograma obtido de EIC com m/z equivalente a possível oxiluciferina.

Em vista destes fatos, foi utilizado um procedimento de concentração via SPE-online, para que fosse possível obter alíquotas suficientemente concentradas, permitindo assim o monitoramento da formação dos produtos/subprodutos provenientes da reação luciferina/luciferase. O objetivo da metodologia usada, conforme descrito no item 3.14.2.3, era fazer com que as moléculas de interesse ficassem retidas na pré-coluna, enquanto moléculas mais polares eram eluídas pela passagem da fase móvel (água contendo 0,1% de HCOOH). Como a 3-hidróxi-hispidina e a possível oxiluciferina possuem anéis aromáticos e ligações π em sua estrutura molecular (Esquema 3, figura 8), as mesmas iriam interagir fortemente com fase estacionária da pré-coluna, que se baseia na interação com compostos aromáticos, garantindo que as mesmas não fossem eluídas. Com a troca das conexões das válvulas, a fase móvel que passa a ser eluída no sistema possui 20% de acetonitrila, e as moléculas de interesse são eluídas da pré-coluna de uma só vez. O procedimento de inverter repentinamente o fluxo na pré-coluna, conhecido como “back-flush”, aliado com o comprimento pequeno (10 mm) da pré-coluna utilizada, permite que a alíquota injetada seja concentrada antes da mesma passar pela coluna/DAD/MS, e também permite que exista uma melhora significativa na resolução dos picos

cromatográficos. Para constatar se a metodologia de fato funcionava, foram injetadas alíquotas do meio reacional, conforme descrito no item 3.14.2.3. Os EIC's obtidos estão representados na figura 48.

Figura 48: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z 's equivalentes a 3-hidróxi-hispidina (preto) e a possível oxiluciferina (vermelho).

Ao analisar os cromatogramas de EIC's da figura 48, é possível notar que os sinais correspondentes a 3-hidróxi-hispidina (m/z $261,05 \pm 0,05$) e a possível oxiluciferina (m/z $249,05 \pm 0,05$) possuem intensidade relativamente alta. Este fato valida a metodologia utilizada, pois a concentração final da luciferina era a mesma das alíquotas injetadas anteriormente, onde não foi possível obter uma intensidade de sinais no EIC adequada. A presença de sinal no EIC com m/z $249,05 \pm 0,05$, correspondente a molécula candidata a oxiluciferina, reforça a hipótese de que a molécula enviada pelo Prof. Ilia Yampolsky (Figura 8) seja correspondente a oxiluciferina.

Figura 49: Espectro de massas obtido no tempo de retenção ($t_r = 6,5$ min) correspondente a 3-hidróxi-hispidina.

Na figura 49, também é possível notar um sinal no EIC com m/z $249,05 \pm 0,05$ no mesmo tempo de retenção ($t_r = 6.5$ min) no EIC correspondente a 3-hidróxi-hispidina. Este sinal é equivalente ao íon com m/z 249,0424 observado no espectro de massas obtido no tempo de retenção citado (Figura 49). Como descrito anteriormente, este sinal é equivalente à possível oxiluciferina, que provavelmente pode estar sendo formada no equipamento de MS, devido a oxidação da 3-hidróxi-hispidina. É importante deixar claro, novamente, que este fato não afetará a detecção da formação do produto via reação luciferina/luciferase, pois o mesmo é formado com um tempo de retenção distinto ao da 3-hidróxi-hispidina.

Figura 50: Espectro de massas obtido no tempo de retenção ($t_r = 8,5$ min) correspondente a possível oxiluciferina.

No espectro de massas referente ao tempo de retenção da possível oxiluciferina ($t_r = 8,5$ min; Figura 50), é possível observar um íon de m/z 231,0314 com intensidade maior do que o íon correspondente a possível oxiluciferina (m/z 249,0420). Mais uma vez, acredita-se que esteja ocorrendo uma reação no aparelho de MS, já que o sinal é encontrado no mesmo tempo de retenção da possível oxiluciferina. Ao verificar a diferença no valor de m/z 's ($249,0420 - 231,0314 = 18,0106$), é possível concluir que este valor é referente a uma

molécula de água, ou seja, o íon de m/z 231,0314 é formado através de uma reação de desidratação da molécula candidata a oxiluciferina. Deste modo, é possível formular um possível mecanismo de reação com um possível produto de reação com o mesmo m/z do íon molecular em questão, conforme mostra o esquema 4.

Esquema 4

Feito isso, foram realizadas as injeções das alíquotas retiradas do meio reacional, conforme descrito no item 3.14.3, para observar a cinética de consumo da 3-hidróxi-hispidina e de formação da possível oxiluciferina. A figura 51 mostra a intensidade dos sinais de EIC correspondentes a 3-hidróxi-hispidina (m/z $261,05 \pm 0,05$) e dos sinais de EIC correspondentes a possível oxiluciferina (m/z $249,05 \pm 0,05$), nas alíquotas retiradas após 1-5 e 10-30 min da reação.

Figura 51: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente a 3-hidróxi-hispidina, após a injeção de alíquotas retiradas do meio reacional em diferentes tempos.

Apenas em relação à 3-hidróxi-hispidina foi possível observar um perfil de diminuição da intensidade dos sinais de EIC correspondentes, onde o mesmo fica próximo de zero após 5 minutos de reação. Já em relação a possível oxiluciferina (Figura 51), não foi possível observar um perfil claro da diminuição ou do aumento dos sinais de EIC correspondentes. A queda repentina da intensidade do sinal de EIC correspondente a 3-hidróxi-hispidina pode ser explicada devido a sua instabilidade (Purtov *et. al.* 2015). Este fato pode ser comprovado analisando o espectro de massas da alíquota retirada após 4 minutos de reação (Figura 52), referente ao seu tempo de retenção ($t_r = 6,6$ min), onde são observados diversos sinais de íons de m/z 's distintos, com intensidade considerável. Não foi observado o mesmo fenômeno para a possível oxiluciferina. No espectro de massas da alíquota retirada após 4 minutos de reação (Figura 53), referente ao seu tempo de retenção ($t_r = 8,5$ min), apenas o íon molecular correspondente a possível oxiluciferina é observado com uma

intensidade considerável, ao contrário do que foi citado anteriormente. Não se sabe ao certo o motivo que justifique tal observação e também o fato de não ser possível observar um perfil claro dos sinais de EIC correspondente a formação da molécula candidata a oxiluciferina, já que somente o íon molecular correspondente a possível oxiluciferina é observado com uma intensidade considerável.

Figura 52: Espectro de massas obtido no tempo de retenção ($t_r = 6,6$ min) correspondente a 3-hidróxi-hispidina.

Figura 53: Espectro de massas obtido no tempo de retenção ($t_r = 8,5$ min) correspondente a possível oxiluciferina.

Paralelamente as injeções, a emissão de luz da reação foi registrada, conforme mostra a figura 54. É possível constatar que a emissão de luz da reação é extremamente intensa, ainda mais se considerarmos que apenas 5% do volume total da reação estava dentro do tubo de ensaio.

Figura 54: Curvas de emissão de luz obtidas de uma alíquota retirada do meio reacional do ensaio quimiluminescente padrão.

Ao analisar as injeções citadas anteriormente pela intensidade dos picos cromatográficos correspondentes as moléculas de interesse, como mostra a figura 55, não foi possível observar um perfil claro do aumento/diminuição dos sinais nos picos cromatográficos em 360 nm ($t_r = 6,6$ min), correspondente a 3-hidróxi-hispidina, e em 380 nm ($t_r = 8,5$ min), correspondente a possível oxiluciferina. Apesar disso, novamente foi obtida uma evidência de que a molécula enviada pelo Prof. Ilia Yampolsky (Figura 8) seja correspondente a oxiluciferina.

Figura 55: Intensidade dos picos cromatográficos em 360 nm, equivalente a 3-hidróxi-hispidina (preto), e em 380 nm, equivalente a possível oxiluciferina (vermelho), obtidos após a injeção de alíquotas retiradas do meio reacional em diferentes tempos.

O fato de não ser possível observar um perfil claro do aumento/diminuição da intensidade dos picos cromatográficos na figura 55 pode ser explicado devido a ocorrência de outros tipos de reações, tanto por uma via enzimática quanto por uma via não enzimática. É importante lembrar que a fração do extrato frio rica em luciferase pode conter outras enzimas, já que a mesma foi apenas ultracentrifugada, não sendo submetida a nenhum tipo de cromatografia.

Apesar de ter sido utilizada a mesma fração do extrato frio rica em luciferase em todos os experimentos descritos até agora, considerou-se que não seria possível fazer um estudo confiável das reações laterais que ocorrem enzimaticamente, uma vez que não se sabe ao certo quantas e quais enzimas adicionais estão presentes no mesmo, assim como a sua reatividade frente a 3-hidróxi-hispidina e a possível oxiluciferina, dificultando assim a identificação e a correlação dos produtos formados pela reação luciferina/luciferase ou por outra via enzimática. O ideal seria utilizar uma fração com luciferase purificada para

este tipo de experimento, trabalho este que esta sendo realizado pelos outros membros do grupo de pesquisa.

Para verificar se havia a formação de algum produto por uma via não enzimática, foi preparada uma solução de 3-hidróxi-hispidina com o tampão fosfato utilizado nos experimentos anteriores (20 mM, pH 7). Foi injetada uma alíquota no HPLC/MS logo após o preparo da solução, e outra após 30 minutos, conforme descrito no item 3.14.4. Os cromatogramas adquiridos estão representados na figura 56.

Figura 56: Picos cromatográficos em 360 nm e de EIC com m/z equivalente a 3-hidróxi-hispidina, após a injeção de alíquotas retiradas da solução logo depois do seu preparo ($T = 0$ min, preto), e após 30 minutos (vermelho).

Observa-se diminuição do sinal de EIC (m/z 261,05 $\pm$ 0,05) e também no pico cromatográfico em 360 nm (Figura 56) correspondente a 3-hidróxi-hispidina após 30 minutos, sinalizando que possa estar ocorrendo uma reação de consumo da mesma por uma via não enzimática.

Ao analisar os sinais de EIC (m/z 249,05 $\pm$ 0,05), e os picos cromatográficos em 380 nm correspondentes a possível oxiluciferina nas mesmas amostras, foi possível identificar que havia a formação da mesma por uma via não enzimática, devido ao aumento da intensidade dos mesmos, como mostra a figura 57. Verificou-se no luminômetro que a reação ocorria sem emissão de luz. Ao se comparar tanto a intensidade dos sinais de EIC, quanto a

intensidade dos picos cromatográficos em 360 nm e 380 nm correspondentes a 3-hidróxi-hispidina e a possível oxiluciferina (Figuras 51, 55-57), observa-se que a taxa de consumo/formação do reagente/produto é consideravelmente maior quando a reação ocorre via enzimaticamente. É importante deixar claro que não está excluída a hipótese da ocorrência de outras reações da 3-hidróxi-hispidina por uma via não enzimática. Nenhuma delas foi citada, pois não foi possível identificar os possíveis produtos formados, e também não foram obtidos dados suficientes para comprovar a ocorrência delas.

Figura 57: Picos cromatográficos em 380 nm e cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente a possível oxiluciferina, após a injeção de alíquotas retiradas da solução logo depois do seu preparo ($T = 0$ min, preto), e após 30 minutos (vermelho).

O mesmo experimento foi realizado com a possível oxiluciferina. Não foram observados indícios de que possíveis reações por uma via não enzimática estejam ocorrendo, uma vez que a intensidade dos sinais permanece a mesma ao longo de 30 minutos, como mostra a figura 58.

Figura 58: Picos cromatográficos em 380 nm e cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente a possível oxiluciferina, após a injeção de alíquotas retiradas da solução logo depois do seu preparo ($T = 0$ min, preto), e após 30 minutos (vermelho).

Em seguida, foram realizados os experimentos de marcação isotópica, com o objetivo de obter dados que auxiliasse na elucidação do mecanismo da reação luciferina/luciferase, resultando na oxiluciferina. Ao realizar o experimento descrito no item 3.14.5, era esperado que 3-hidróxi-hispidina

reagisse com as moléculas de $^{18}\text{O}_2$ presentes na atmosfera do sistema, resultando em moléculas de oxiluciferina com átomo(s) de ^{18}O incorporado(s) a sua estrutura molecular. Conforme descrito no item 3.14.5, alíquotas retiradas após 5, 15 e 20 minutos de reação foram injetadas no equipamento de HPLC/MS. Os cromatogramas adquiridos de EIC com m/z equivalente a 3-hidróxi-hispidina está representado na figura 59.

Figura 59: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente a 3-hidróxi-hispidina, após a injeção de alíquotas retiradas do meio reacional em diferentes tempos.

Ao analisar a figura 59, observa-se uma diminuição do sinal de EIC com m/z 261,05 correspondente a 3-hidróxi-hispidina, indicando o consumo da mesma. É possível argumentar que somente foi possível observar o perfil porque apenas três alíquotas foram retiradas do meio reacional, ao contrário do que aconteceu no experimento citados anteriormente. Poucas alíquotas foram retiradas do meio reacional em questão, pois, apesar da vedação do sistema estar funcionando perfeitamente, considerou-se que a retirada de diversas alíquotas poderia provocar a ruptura do septo, permitindo a entrada de ar do ambiente dentro do sistema.

Comparando os sinais de EIC's (m/z 261,05 $\pm$ 0,05) correspondente a 3-hidróxi-hispidina das alíquotas retiradas no mesmo tempo de reação (5 e 20 minutos) (Figuras 60 e 61), no experimento realizado no tubo de ensaio (descrito anteriormente) e o realizado no sistema fechado com $^{18}\text{O}_2$, nota-se que a intensidade dos sinais de EIC's correspondentes a 3-hidróxi-hispidina, tanto após 5 e 20 minutos, são maiores no experimento realizado no sistema fechado, apesar da concentração de 3-hidróxi-hispidina ser a mesma em ambos experimentos. Isto pode ser um indício de que o sistema utilizado poderia não estar com a fase aquosa devidamente saturada com $^{18}\text{O}_2$, uma vez que a reação luciferina/luciferase necessita de oxigênio molecular para ocorrer (Esquema 3). Não foi possível obter os cromatogramas de UV-vis em 360 nm e em 380 nm devido a um problema no detector de DAD.

Figura 60: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente a 3-hidróxi-hispidina, após a injeção de alíquotas retiradas do meio reacional após 5 minutos de reação, no sistema fechado (preto) e no sistema aberto (azul).

Figura 61: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente a 3-hidróxi-hispidina, após a injeção de alíquotas retiradas do meio reacional após 20 minutos de reação, no sistema fechado (preto) e no sistema aberto (azul).

Já em relação à possível oxiluciferina, novamente não foi possível observar um perfil claro de formação da mesma, como é mostrado na figura 62. Somente é possível afirmar que ela, de fato, é um produto formado na reação luciferina/luciferase, sendo este mais um indício de a molécula enviada pelo Prof. Ilia Yampolsky (Figura 8) seja correspondente a oxiluciferina. A ausência de um perfil claro representando a formação da possível oxiluciferina pode ser explicada pela ocorrência de outros tipos de reações via enzimática, como descrito anteriormente. É importante citar também que foi verificada que a molécula não sofre reações de degradação por uma via não enzimática, como mostra a figura 58.

Figura 62: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente a possível oxiluciferina, após a injeção de alíquotas retiradas do meio reacional em diferentes tempos.

Também foi analisado o espectro de massas referente ao tempo de retenção da possível oxiluciferina ($t_r = 8,5$ min) (Figura 63), na alíquota retirada do meio reacional após 20 minutos de reação, com o intuito de verificar a formação de moléculas com átomo(s) de ^{18}O incorporado(s) a sua estrutura molecular.

Figura 63: Espectro de massas obtido no tempo de retenção ($t_r = 8,5$ min) correspondente a possível oxiluciferina.

Em uma abordagem inicial da análise do espectro de massas representado na figura 63, é possível constatar que havia sido formada a oxiluciferina sem a incorporação de nenhum átomo de ^{18}O , devido a presença

de um sinal com m/z 249,0432. Este sinal pode ter aparecido em razão da presença de $^{16}\text{O}_2$ no sistema, que poderia estar contido na seringa usada para a injeção no sistema da fração do extrato frio rica em luciferase e da solução de 3-hidróxi-hispidina, ou até mesmo devido a presença do mesmo nas soluções injetadas. Pode-se especular também que o mecanismo envolvido na reação luciferina/luciferase resultando em oxiluciferina não envolva a incorporação de átomos de O da atmosfera pela molécula em questão, porém, além de nenhum mecanismo deste tipo ter sido descrito na literatura até o momento (Shimomura 2006, Dubinnyi *et al.* 2015), não foi possível elaborar um mecanismo compatível em que ocorra a observação em questão.

Figura 64: Perfil isotópico de oxigênio (preto) esperado para um sinal de m/z (verde) com intensidade de aproximadamente 2900 a.u., calculado com base na fórmula molecular da possível oxiluciferina ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_6$), obtido no tempo de retenção ($t_r = 8.5$ min) correspondente a possível oxiluciferina.

Ao traçar o perfil isotópico esperado para o sinal com m/z 249,0432 (sem oxigênio-18), função esta realizada pelo software de análise de dados do equipamento, gerado com base na fórmula molecular da possível oxiluciferina ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_6$), foi detectada uma intensidade acima da esperada para o sinal de m/z (m/z 251,0459), correspondente a incorporação de um átomo de ^{18}O pela

molécula candidata a oxiluciferina, como mostra a figura 64. Na mesma figura também é possível observar um sinal de m/z (m/z 253,0645), que é correspondente a incorporação de dois átomos de ^{18}O pela molécula candidata a oxiluciferina. Apesar de não serem indícios irrefutáveis que permitam estabelecer o mecanismo da reação, uma vez que a intensidade dos mesmos é baixa, foram elaborados dois mecanismos de reação que justificariam a incorporação de um ou de dois átomos de ^{18}O pela possível oxiluciferina (Esquema 5).

Esquema 5

No mecanismo proposto no esquema 5, ocorre a desprotonação da hidroxila ligada ao carbono na posição 4, e em seguida, a formação do radical da 3-hidróxi-hispidina, reação essa mediada pela luciferase. Na etapa seguinte há a adição de $^{18}\text{O}_2$ no radical da 3-hidróxi-hispidina, resultando na formação do peróxido-18 da 3-hidróxi-hispidina. Este tipo de mecanismo é comumente observado em oxidações enzimáticas mediadas por ferro ou flavinas (Keher 2000; Poulsen & Ziegler 1995). A partir daí, o peróxido pode realizar adição nucleofílica direta na carboxila do éster (via **a**) ou adição nucleofílica indireta (tipo Michael) na dupla conjugada à carbonila da cetona (via **b**). A via **a** leva a formação da possível oxiluciferina com um átomo de ^{18}O incorporado a sua estrutura molecular, enquanto que a via **b** resultaria na formação da possível oxiluciferina com dois átomos de ^{18}O incorporado à sua estrutura molecular. Não foram detectados outros sinais de m/z que fossem equivalentes a moléculas com átomo(s) de ^{18}O incorporado(s).

Para verificar a eficiência do processo, foi adicionado um derivado de antraceno sulfonado (AVS, Figura 10) ao meio reacional, conforme descrito no item 3.14.5. O derivado de antraceno tem como função a incorporação da molécula de oxigênio presente na atmosfera do sistema utilizado. Para isso, irradia-se luz no sistema, fazendo com que os elétrons dos orbitais HOMO das moléculas de AVS passem para um estado eletronicamente excitado, cuja energia proveniente do decaimento do estado eletronicamente excitado para o estado fundamental é transferida para as moléculas de oxigênio (neste caso, do estado tripleto, $^3\text{O}_2$), presentes no sistema, resultando na formação de oxigênio molecular singlete, $^1\text{O}_2$. Em seguida, o oxigênio molecular singlete formado reage com o AVS no estado fundamental, formando um endoperóxido Esquema

6, Ronsein *et al.* 2006). Deste modo, é possível comprovar a presença de $^{16}\text{O}_2$ e de $^{18}\text{O}_2$ no sistema, e também determinar qual a porcentagem de moléculas do derivado de antraceno utilizado tiveram $^{18}\text{O}_2$ incorporados a sua estrutura molecular.

Esquema 6

Uma alíquota foi retirada do meio reacional, após a adição do derivado de antraceno, conforme descrito no item 4.14.5. Após 27 minutos de corrida cromatográfica, foram observados sinais de EIC com m/z $423,03 \pm 0,05$ e m/z $427,03 \pm 0,05$ (Figura 65), correspondentes ao derivado de antraceno, com uma carga negativa, oxidado por $^{16}\text{O}_2$ e por $^{18}\text{O}_2$, respectivamente.

Figura 65: Cromatogramas obtidos de EIC com m/z equivalente ao derivado de antraceno oxidado por $^{16}\text{O}_2$ (preto), e ao derivado de antraceno oxidado por $^{18}\text{O}_2$ (vermelho).

Para verificar a eficiência da marcação isotópica, foram comparadas as intensidades dos sinais de m/z correspondentes ao derivado de antraceno, ao derivado oxidado por $^{16}\text{O}_2$ e ao derivado oxidado por $^{18}\text{O}_2$, no espectro de massas referente ao tempo de retenção dos mesmos ($t_r = 27$ min) (Figura 66).

Figura 66: Espectro de massas obtido no tempo de retenção ($t_r = 27$ min). Os sinais com m/z 388.0177, m/z 423.0216 e m/z 427.0232 são correspondentes, respectivamente, ao derivado de antraceno, ao derivado oxidado por $^{16}\text{O}_2$ e ao derivado oxidado por $^{18}\text{O}_2$.

Após a análise da figura 66, afirma-se que apenas 4% das moléculas do derivado de antraceno foram oxidadas durante o processo, sendo que 2,6 % das moléculas do derivado de antraceno oxidadas incorporaram o $^{18}\text{O}_2$. Em outras palavras, isto significa que o sistema não estava devidamente saturado com $^{18}\text{O}_2$. Este fato pode ser explicado devido à ausência de um intervalo adequado para o equilíbrio entre a fase aquosa e a fase gasosa. O $^{16}\text{O}_2$ pode ter sido inserido no sistema devido a presença do mesmo na solução do extrato frio e na solução de 3-hidróxi-hispidina, ou também por o sistema não ter sido devidamente desgasificado no início do experimento. Em todo caso, utilizar um

meio reacional devidamente saturado com $^{18}\text{O}_2$ poderá resultar na obtenção de provas concretas que permitam a elucidação do mecanismo da reação luciferina/luciferase. Vale lembrar também que, os mecanismos citados anteriormente, foram elaborados com base nos indícios descritos anteriormente, sendo que nenhum dado irrefutável foi obtido para sustentar a ocorrência deles.

5. Conclusão

Inicialmente, pode-se dizer que foi obtida uma metodologia eficiente para a purificação do precursor da luciferina fúngica. Após a determinação desta metodologia, foi possível obter uma correlação entre a presença de um íon molecular equivalente a um composto de massa molecular $246,04 \pm 0,05$ u com a atividade positiva do EPEL, e também estabelecer novas condições cromatográficas para a purificação da molécula em questão. Apesar disso, julgou-se que não era correto afirmar que o composto com a massa citada era correspondente ao precursor da luciferina fúngica, uma vez que a massa molecular em questão não foi determinada precisamente. Após a publicação do trabalho de Purto e colaboradores caracterizando a estrutura molecular do precursor da luciferina, foi evidenciado que, de fato, o precursor da luciferina fúngica era uma molécula com massa exata 246,05 u, conforme os resultados obtidos por este grupo de pesquisa indicavam.

Também foram obtidos alguns dados preliminares no que diz respeito a cinética da reação luciferina/luciferase e ao rendimento quântico de quimioluminescência da reação. Foi constatado que a constante de decaimento não possui uma variação acentuada quando os parâmetros do ensaio quimioluminescente padrão são variados. É importante lembrar também que o

rendimento quântico de fluorescência de uma molécula candidata a oxiluciferina foi determinado.

Em relação à elucidação da estrutura molecular da oxiluciferina de fungos bioluminescentes, foram obtidos alguns resultados que reforçam a hipótese de que a molécula enviada pelo Prof. Ilia Yampolsky seja, de fato, correspondente à oxiluciferina. A natureza da mesma poderá ser confirmada de maneira irrefutável assim que a luciferase fúngica for devidamente purificada. Em relação ao mecanismo da reação luciferina/luciferase, foram encontradas algumas dificuldades para determiná-lo, uma vez que o sistema de emissão de luz em fungos se apresentou de uma forma muito mais complexa do que era esperado, onde a presença de reações laterais e vias de degradação ocorriam paralelamente à reação de emissão de luz catalisada pela luciferase. Mesmo assim, foram obtidos indícios que permitiram a proposta de mecanismos alternativos que descrevessem como a emissão de luz poderia ocorrer em fungos bioluminescentes. Portanto, pode-se concluir que a obtenção de todos os dados descritos nesta tese desempenharam um papel preliminar, porém fundamental, na elucidação do mecanismo de emissão de luz em fungos bioluminescentes.

6. Referências

1. Airth, R. L. *Characteristics of Cell-Free Fungal Bioluminescence*; The Johns Hopkins Press: Baltimore, **1961**.
2. Airth, R. L.; Foerster, G. E. *Am. J. Bot.* **1965**, 52, 495.
3. Airth, R. L.; Foerster, G. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 97, 567.
4. Airth, R. L.; Foerster, G. E. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1960**, 56, 173.
5. Airth, R. L.; McElroy, W. D. *J. Bacteriol.* **1959**, 77, 249.

6. Aitken, C. E.; Marshall, R. A.; Puglisi, J. D. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1826.
7. Badr, C. H.; Tannous, B. A. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 624.
8. Beckert, C.; Horn, C.; Schnitzler, J.-P.; Lehning, A.; Heller, W.; Veit, M.; *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 275.
9. Campbell, A. K. *Chemiluminescence – Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Horwood: Chichester, **1988**.
10. Cormier, J. C.; Hori, K.; Karkhanis, Y. D.; Anderson, J. M.; Wampler, J. E.; Morin, J. G.; Hastings, J. W. *J. Cell Physiol.* **1973**, *81*, 291.
11. Desjardin, D. E.; Capelari, M.; Stevani, C. V. *Mycologia* **2007**, *99*, 317.
12. Desjardin, D. E.; Braga-Neto, R. *Edinburgh J. Bot.* **2007**, *64*, 275.
13. Desjardin, D. E.; Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 170.
14. Desjardin, D. E.; Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. *Mycologia* **2010**, *102*, 459.
15. Dubois, R. C. *R. Soc. Biol.* **1887**, *39*, 564.
16. Endo, M.; Kajiwara, M.; Nakanishi K. *Chem. Commun.* **1970**, 309.
17. Haddock, S. H. D.; Moline M. A.; Case, J. F. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2010**, *2*, 443.
18. Harvey, E. N. *A History of Luminescence from Ancient Times to 1900*; J. H. Furst Company: Baltimore, **1957**.
19. Harvey, E. N. *Living Light*; Princeton University Press: New Jersey, **1940**.
20. Harvey, E. N. *The Nature of Animal Light*; L. B. Lippincott: Philadelphia, **1920**.
21. Harvey, E. N. *Science*, **1916**, *44*, 208.
22. Isobe, M.; Uyakul D.; Goto, T. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1987**, *1*, 181.
23. Isobe, M.; Uyakul, D.; Goto, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *44*, 1169.

24. Johnson, F. N.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Gershman, L. C.; Reynolds, G. T.; Waters, J. R. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *60*, 85.
25. Johnson, F. H.; Sugiyama, N.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Haneda, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1961**, *47*, 486.
26. Kehrer, J. P. *Toxicology* **2000**, *149*, 43.
27. Kohama, Y.; Shimomura, O.; Johnson, F. H. *Biochemistry* **1971**, *10*, 4149.
28. Kuwabara, S.; Wassink, E. C. "Purification and Properties of the Active Substance of Fungal Luminescence", In: *Bioluminescence in Progress*; Princeton University Press: New Jersey, **1966**.
29. Lee, I. K.; Yun, B. S.; *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 349.
30. Lee, J.; Wesley A. S.; Ferguson J. F.; Seliger, H. H. "The use of luminol as a standard of photon emission", In: *Bioluminescence in Progress*; Princeton University Press: New Jersey, **1966**.
31. Lim, J.-H.; Lee, Y.-M.; Park, S. R.; Kim, D. H.; Lim, B. O. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 4087.
32. Morin, J. G.; Hastings, J. W. *J. Cell Physiol.* **1971a**, *77*, 303.
33. Morin, J. G.; Hastings, J. W. *J. Cell Physiol.* **1971b**, *77*, 313.
34. Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Winant, J. *Biochemistry* **1974**, *13*, 2656.
35. Musicki, B.; Kishi, Y.; Shimomura, O. *Chem. Commun.* **1986**, *21*, 1566.
36. Nakamura, H.; Kishi, Y.; Shimomura, O. *Tetrahedron.* **1988**, *44*, 1597.
37. Nakamura, H.; Kishi, Y.; Shimomura, O.; Morse, D.; Hastings, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7607.
38. Oliveira, A. G. *Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos*; Tese de Doutorado, IQ-USP, 2010.

39. Oliveira, A. G.; Desjardin, D. E.; Perry, B. A.; Stevani C. V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11, 848.
40. Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, 8, 1416.
41. Oliveira, A. G.; Stevani, C. V.; Waldenmaier, H. E.; Viviani, V.; Emerson, J. M.; Loros, J. J.; Dunlap, J. C. *Cur. Bio.* **2015**, 25, 964.
42. Park, I.-H.; Chung, S.-K.; Lee, K.-B.; Yoo, Y.-C.; Kim, S.-K.; Kim, G.-S.; Song, K.-S.; *Arch. Pharm. Res.* **2004**, 27, 615.
43. Petushkov, V. N.; Dubinnyi, M. A.; Tsarkova, A. S.; Rodionova, N. S.; Baranov, M. S.; Kublitski, V. S.; Shimomura, O; Yampolsky, I. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 5566.
44. Poulsen, L. L.; Ziegler, D. M. *Chem.-Biol. Interact.* **1995**, 96, 57.
45. Purtov, K. V.; Petushkov, V. N.; Baranov, M. S.; Mineev, K. S.; Rodionova, N. S.; Kaskova, Z. M.; Tsarkova, A. S.; Petunin, A. I.; Bondar, V. S.; Rodicheva, E. K.; Medvedeva, S. E.; Oba, Y.; Oba, Y.; Arseniev, A. S.; Lukyanov, S.; Gitelson, J. I.; Yampolsky, I. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8124.
46. Shimomura, O. *Bioluminescence – Chemical Principles and Methods*; World Scientific Publishing Co. Pte. Lt.: Singapore, **2006**.
47. Shimomura, O. *J. Exp. Botany* **1991**, 42, 555.
48. Shimomura, O. *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 355.
49. Shimomura, O. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1985**, 39, 351.
50. Shimomura, O.; Johnson, F. H. *Biochemistry* **1969**, 8, 3991.
51. Shimomura, O.; Johnson, F. H. "Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescence system", In: *Bioluminescence in Progress*; Princeton University Press: New Jersey, **1966**.

52. Shimomura, O.; Johnson, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1978**, 75, 2611.
53. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223.
54. Silva, M. S.; Wagner, K.; Weiss, D.; Beckert, R.; Stevani, C. V.; Baader, W. J.; *Luminescence*, **2002**, 17, 362.
55. Stevani, C. V.; Silva, S. M.; Baader W. J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 24, 4037.
56. Wiedemann, E. *Ann. der Physik* **1888**, 34, 446.
57. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U.; *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 3431.
58. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U.; *Nat. Protoc.*, **2013**, 8, 1535.

Súmula curricular

Rodrigo Pimenta Carvalho

Data de nascimento: 15/04/1990

Formação acadêmica

Fev/2012 – Jul/2016 **Universidade de São Paulo**

Doutorado em Química

Fev/2008 – Dez/2011 **Universidade de São Paulo**

Bacharel em Química

Publicações

- C. V. Stevani, A. G. Oliveira, L. F. Mendes, F. F. Ventura, H. E. Waldenmaier, R. P. Carvalho, T. A. Pereira. "Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application". *Photochem. Photobiol.* 89: 1318-1326 (2013).
- A. G. Oliveira, R. P. Carvalho, H. E. Waldenmaier, C. V. Stevani. "Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz". *Quim. Nova* 36: 314-319 (2013).

Resumos em congressos

- "Purification of fungal luciferin". 16th International Congress on Photobiology (Sep/2014), Cordoba, Argentina.
- "Purificação da luciferina fúngica". II Congresso Institucional do Instituto de Química da USP (Set/2012), Guarujá, Brasil.

Atividades complementares

- Monitor das seguintes disciplinas:
 - QFL2343 – Química Orgânica Experimental (Ago/2014 - Dez/2014);
 - QFL0605 – Química Geral (Fev/2014 - Jul/2014);
 - QFL0342 – Reatividade de Compostos Orgânicos I (Ago/2012 - Dez/2012);
 - QFL0314 – Química Orgânica Experimental (Fev/2012 - Jul/2012).
- Representante discente da Congregação do Instituto de Química (Fev/2013 - Fev/2014).
- Suplente do representante discente da Comissão Coordenadora do Programa de Química (Fev/2013 – Fev/2014).
- Membro da comissão organizadora do IV Encontro da Pós-graduação do IQ-USP (Set/2013).