

Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos.

Anderson Garbuglio de Oliveria (PG)* e Cassius Vinicius Stevani (PQ).

Instituto de Química – Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Química Fundamental, São Paulo, Brasil.
*andgarb@iq.usp.br

Palavras-chave: luciferina, luciferase

Introdução

Nas últimas décadas, o isolamento e caracterização de enzimas, substratos e proteínas fluorescentes em vaga-lumes, dinoflagelados, celenterados e bactérias bioluminescentes permitiu que houvesse uma maior compreensão do mecanismo químico-enzimático envolvido processo de bioluminescência (BL) e levou ao desenvolvimento de diversas ferramentas analíticas. Entretanto, existem alguns sistemas bioluminescentes sobre os quais pouco ou quase nada é sabido. A BL de fungos é um exemplo. A clássica reação de Dubois, feita a partir do extrato quente (EQ) e frio (EF), respectivamente fonte de substrato e enzimas, tem a finalidade de determinar os componentes do sistema, porém nunca foi bem estabelecida para fungos. Dúvidas, como se há o envolvimento de uma enzima (luciferase - *Lase*) no processo de emissão de luz e qual é o substrato dessa reação (luciferina - *Ln*) permanecem. Quanto à natureza do mecanismo de emissão de luz em fungos existem duas hipóteses conflitantes: a enzimática, proposta por Airth e Foerster e a não enzimática, proposta por Shimomura.^{1,2} O presente estudo tem como objetivo mostrar que feito sob condições adequadas, é possível demonstrar que a BL em fungos depende de ao menos duas enzimas (hipótese enzimática, portanto). Além disso, é possível purificar a *Ln* fúngica com um grau de pureza bastante satisfatório através de técnicas como extração acelerada com solvente (ASE) e HPLC.

Resultados e Discussão

Dificuldades na execução da reação de Dubois para fungos no passado devem-se, principalmente, a alta labilidade dos componentes, tornando-os rapidamente inativos.¹ Preparando-se o EQ a partir de fungos liofilizados e sob atmosfera de nitrogênio foi possível diminuir a decomposição da *Ln* fúngica e assim obter emissão de luz *in vitro* a partir do EQ e do EF, utilizando fungos bioluminescentes das espécies *Gerronema viridilucens*, *Mycena luxaeterna* e *Omphalotus spp.* Dessa maneira, para que exista emissão de luz são necessários três fatores: EQ, EF e NAD(P)H. Os resultados indicam ainda que o EQ deva conter a *Ln* e no EF existam ao menos duas enzimas envolvidas, uma redutase

(*Rdse*) dependente de NAD(P)H e uma *Lase*. Na primeira etapa a *Ln* é reduzida pela ação *Rdse* levando a formação de um intermediário que é oxidado pela *Lase* na etapa seguinte, com concomitante emissão de luz, de acordo com a proposta de Airth e Foerster.

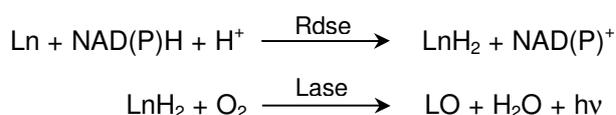


Figura 1. Proposta enzimática para o mecanismo de bioluminescência fúngica, segundo Airth e Foerster.

A *Ln* foi purificada partindo-se de 300 g de cogumelos bioluminescentes secos. O EQ obtido através de um extrator ASE 300, Dionex® foi pré-purificado por sucessivas extrações quimicamente ativas com acetato de etila. A fase orgânica contendo a *Ln* foi totalmente seca e re-dissolvida em uma solução aquosa contendo HCOOH (0,025%), pH 3,0 e 2mM de 2-mercaptoetanol. Essa solução final foi injetada e purificada em HPLC. Durante todo o processo de separação, seguiu-se a atividade da *Ln* através de sua emissão de luz frente à reação de Dubois, utilizando EF e NAD(P)H. Devido à extrema facilidade de oxidação da *Ln* as etapas de separação foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio ultra-puro sempre que possível.

Conclusões

Foi possível demonstrar que a BL fúngica é um processo enzimático dependente de NAD(P)H. Essa hipótese mecanística foi utilizada com sucesso na forma de ensaio para se determinar a atividade da *Ln* durante sua purificação.

Agradecimentos

FAPESP

¹ Shimomura, O. *Bioluminescence – Chemical Principles and Methods*. 2006, 1ª ed., World Scientific Publishing, Singapore.

² Desjardin, D. E.; Oliveira, A. G. e Stevani, C. V. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008, 7, 170.