

Artigo

Luzes Vivas na Escuridão: Fatos e Casos

Bechara, E. J. H;* Viviani, V. R.

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (1), 3-40. Data de publicação na Web: 25 de outubro de 2014<http://www.uff.br/rvq>**Living Light in the Darkness: Facts and Stories**

Abstract: This article concerns the public dissemination of various aspects of the biology, chemistry, ecology and technology of three families of bioluminescent insects of the order Coleoptera, commonly named beetles: Lampyridae, fireflies; Elateridae, click-beetles; and Phengodidae, railroad worms. We embrace here their occurrence in the Brazilian “cerrados”, field behavior and laboratory observations, chemical mechanisms of color modulation, the cooperation between Luciferase and superoxide dismutase to regulate the redox balance, the biotechnology of Luciferases, and the magnificent and unique spectacle of the “luminous termite mounds”.

Keywords: Bioluminescence; Coleoptera; luciferase.

Resumo

Este artigo visa à divulgação pública de vários aspectos da biologia, química, ecologia e tecnologia de insetos bioluminescentes pertencentes a três famílias da ordem Coleoptera, popularmente conhecidos como besouros: Lampyridae, vagalumes; Elateridae, pirilampus; e Phengodidae, “trenzinhos”. O artigo aborda particularmente sua ocorrência nos cerrados brasileiros, observações de seu comportamento em campo e laboratório, os mecanismos químicos de modulação da cor, a cooperação entre Luciferase e superóxido dismutase para regular o balanço redox, a biotecnologia das Luciferases e o magnífico e exclusivo espetáculo dos “cupinzeiros luminosos”.

Palavras-chave: Bioluminescência; Coleópteros; Luciferase.

* Universidade de São Paulo, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, CEP 05588-900 São Paulo-SP, Brasil.

✉ ejhbechara@gmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20150002](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150002)

Luzes Vivas na Escuridão: Fatos e Casos

Etelvino J. H. Bechara,^{a,*} Vadim R. Viviani^b

^a Universidade de São Paulo, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, CEP 05588-900 São Paulo-SP, Brasil.

^b Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, Departamento de Física, Química e Matemática, CEP 18052-780, Sorocaba-SP, Brasil.

* ejhbechara@gmail.com

Recebido em 25 de outubro de 2014. Aceito para publicação em 25 de outubro de 2014

1. Introdução à bioluminescência
2. Funções biológicas e cores da bioluminescência
3. Diversidade química das luciferinas
4. O sistema luciferina/luciferase e mecanismo da reação da bioluminescência de coleópteros luminescentes
5. Ligases versus luciferases: Uma proposta para a evolução da bioluminescência
6. Comunicação sexual nos coleópteros luminescentes
7. Quanto oxigênio é consumido para emissão de flashes?
8. A bioluminescência funciona como mecanismo auxiliar na desintoxicação do oxigênio?
9. Os cupinzeiros luminosos do cerrado
10. Coleta, criação e descrição de espécies de insetos luminescentes
11. Aplicações tecnológicas da bioluminescência
12. E o futuro da pesquisa da bioluminescência de insetos no Brasil?

1. Introdução à bioluminescência

Nas noites úmidas e quentes de zonas tropicais e temperadas, miríades de besouros luminosos povoam matas e charcos numa busca frenética pelo parceiro sexual para reprodução. É o voo nupcial dos vagalumes e pirilampos, nitidamente perceptível nas

noites escuras de lua nova, longe de lâmpadas e lampiões acesos, encantando e despertando muitas perguntas de crianças e adultos: Como se explica uma luz tão forte que não queima como o fogo? Por quê estes insetos emitem luz? Pode-se tirar algum proveito do estudo deste fenômeno?

O contraste entre luz – alusiva ao bem, conhecimento, verdade, santidade e vida - e

a escuridão - sugestiva do mal, ignorância, medo, pecado e morte -, atíça a superstição e religiões dos povos desde tempos imemoriais.¹ Não por outro motivo, o Sol foi erigido como o Deus supremo de povos antigos avançados como os egípcios, incas, astecas e maias. Os vagalumes (*fireflies*) e suas larvas (*glow worms*) – “a luz no escuro” - são registrados nos escritos venerados dos indianos e chineses desde 1500-1000 AC, mas estão ausentes na Bíblia, no Alcorão e no Talmud, os livros sagrados dos povos do Oriente Médio, essencialmente desérticos.¹ Água e umidade - este é o primeiro requisito de habitat para os insetos luminescentes. No Brasil, as primeiras referências a insetos luminosos aparecem na carta do colono português Gabriel de Souza (1587) a D. Felipe II, rei de Portugal e Espanha, em que o primeiro trecho refere-se a “vagalumes” (lampirídeos) e o segundo, provavelmente a “trenzinhos” (fengodídeos):²

“Na Bahia se criam uns bichos, a que os índios chamam mamoads, aos quais chamam em Portugal lucernas, e outros cagalumes, que andam em noites escuras, assim em Portugal como na Bahia, em cujos matos os há muito grandes; os quais entram de noite nas casas às escuras, onde parecem candeias muito claras, porque alumiam uma casa toda...”

“Também se criam outros bichos na Bahia muito estranhos, a que os índios chamam buijejas, que são do tamanho de uma lagarta de fogo ... Tem esse bicho uma natureza tão estranha que parece encantamento, e tomando-o na mão parece um rubim, mui resplandecente, e se o fazem em pedaços, se torna logo a juntar e anda como dantes...”

É notável a impressão realçada na literatura mundial sobre a alta **intensidade da luz** emitida por estes insetos, a ponto de alguns deles – os pirilampos (elaterídeos) –, permitirem a leitura de um texto, trabalhos manuais ou uso como adereços. Outra característica - a **variedade de cores da luz**-, do verde (538 nm) ao vermelho mais puro (620 nm), passando pelo amarelo e o alaranjado, também é ressaltada em muitos textos literários e científicos.³

Bioluminescência de cor azul por insetos é emitida apenas por larvas de moscas de dípteros que habitam o teto de cavernas da Nova Zelândia e Austrália (*Arachnocampa* spp, 480 nm) e barrancos dos Montes Apalaches dos Estados Unidos da América (*Orfelia*, 460 nm).³ Não surpreende que luzes tão vivas e coloridas, percorrendo todo o espectro visível, tenham inspirado poetas, romancistas, pintores e músicos. Cassiano Ricardo, por exemplo, enaltece a luz intensa dos pirilampos em seu conto *A Lanterna Mágica*, ao colocar na mão do Saci uma lanterninha de pirilampos para ele procurar o sol da Terra, à noite, numa mata escura. A propósito, uma caixa transparente com mais de vinte pirilampos é capaz de iluminar toda uma sala.

*“... o próprio Curupira ficou com pena (do Saci) e lhe arranhou uma **lanterna** de pirilampos. Vá por aqui, direitinho, com esta lanterna na mão, alumando o caminho... e você encontrará o que procura! E ele saiu pelo sertão, procurando o Sol da Terra com uma lanterna de pirilampos na mão.”*

E Graça Aranha, impressionado pela variedade de cores emitidas por insetos luminosos, descreve em *Canaã*:

*“Os primeiros vaga-lumes começavam no bojo da mata a correr suas lanternas divinas. No alto, as estrelas miúdas e sucessivas principiavam também a iluminar... E os pirilampos se incrustavam nas folhas, aqui, ali e, além, mesclados com os pontos escuros, cintilavam esmeraldas, safiras, rubis, ametistas e as mais pedras que guardam parcelas das **cores** divinas e ternas.”*

A esta altura, podemos nomear e descrever com maior precisão as principais famílias destes besouros luminosos. Eles estão classificados em três famílias principais (Figura 1):³⁻⁶ (i) Os vagalumes ou lampirídeos (**Lampyridae**), com uma ou mais lanternas no lado ventral do abdômen, as quais emitem flashes de luz com duração de frações de segundos e cores variando entre o verde-amarelado ao amarelo (picos de emissão entre 550 e 580 nm); (ii) Os pirilampos ou elaterídeos (**Elateridae**), com um par de

lanternas no segmento distal-dorsal do protórax (confundidos frequentemente com olhos), emissoras de luz verde (525-560 nm) quando caminhando, e uma lanterna amarela ou alaranjada (560-585 nm) exposta durante o voo, localizada ventralmente entre o mesotórax e o abdômen; e, (iii) Os trenzinhos ou fengodídeos (**Phengodidae**), cujos machos alados, com antenas flabeladas e élitros, apresentam lanternas dorsais de cor variada entre o verde ao alaranjado, e cujas larvas e fêmeas, ápteras e larviformes, têm uma

lanterna cefálica de cor verde (*Phengodes*) ao vermelho (*Phrixothrix*) - tal qual rubis, as “buijejas” do Gabriel de Souza? - e onze pares de lanternas lateralmente dispostas ao longo do abdômen de cores verde, verde-amarelado, amarelo ou laranja, dependendo da espécie. Os fengodídeos e alguns peixes das regiões abissais do mar (e.g., os peixes-dragão *Malacosteus*, *Aristostomias* e *Pachystomias*; emissões de cor azul e vermelha 705 nm) são os únicos seres luminescentes que emitem luz vermelha.⁷

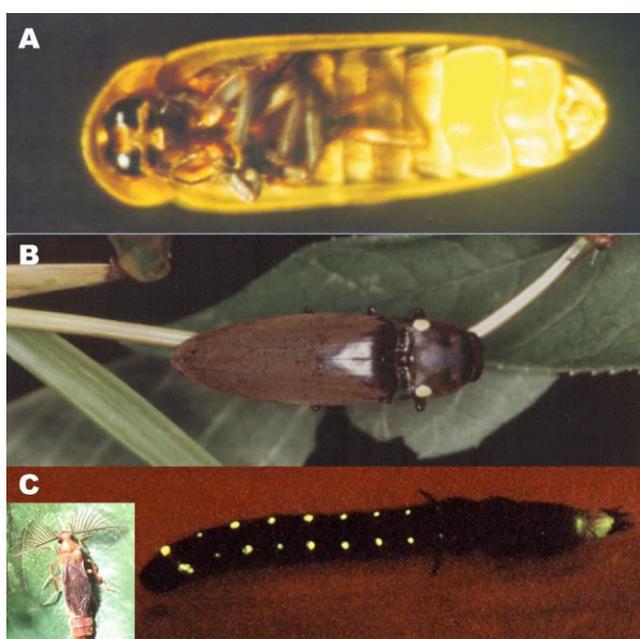


Figura 1. Exemplos das três principais famílias de coleópteros luminescentes: Lampyridae (*Macrolampis* sp.) (A), Elateridae (*Pyrophorus* sp.) (B) e Phengodidae (*Brasilocerus* sp.) (C), larva e adulto macho não identificado). Fotos: Vadim Viviani (UFSCar) e Sérgio Vanin (IBUSP)

Todos os besouros são insetos holometábolos, isto é, têm metamorfose completa, definida pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto e emitem luz ao longo de todo seu ciclo de vida. Segundo Costa,⁸ o Brasil possui cerca de 350 espécies de vagalumes, representando 18% das espécies descritas no planeta, cerca de 6% dos pirilampos (590

espécies), nem todas luminescentes; e 5% dos trenzinhos (19 espécies), ampliada posteriormente para 30% (50 espécies) por Wittmer⁹ e enriquecida recentemente por Viviani e Bechara¹⁰ (Tabela 1). Estima-se que as populações de elaterídeos e fengodídeos no Brasil devam representar no conjunto acima de 20% das espécies já descritas.

Tabela 1. Distribuição de coleópteros bioluminescentes no Brasil e no mundo.⁸ *Segundo Wittmer (1997).⁹ Nota: O número de elaterídeos inclui espécies não luminescentes

Famílias	Brasil		Mundo	
	Gêneros	Espécies	Gêneros	Espécies
Elateridae (pirilâmpas)	81	590 (6%)	414	9.300
Lampyridae (vagalumes)	31	350 (18%)	100	2.000
Phengodidae (trenzinhos)	-	19 (49)* (30%)	35	200 (170)*

2. Funções biológicas e cores da bioluminescência

Os organismos bioluminescentes emitem luz para se comunicarem no escuro, tanto entre indivíduos de uma mesma espécie (sinalização intra-específica) para, por exemplo, fazer a corte e atração sexual ou reunir as criaturas num bando, como entre animais distintos (sinalização inter-específica) para atração de uma presa, repelir um predador, ou camuflar-se no ambiente fótico (Figura 2). São descritos e muitas vezes observáveis belíssimos e curiosos exemplares terrestres e marinhos de seres com luz própria, recentemente ilustrados e descritos com linguagem acessível a não especialistas por Thérèse Wilson e John Woodland Hastings (Biological Laboratories, Harvard University)¹¹ num divertido e abrangente livro, criativamente intitulado *Bioluminescence: Living Lights, Lights for Living*, (“Luz Viva, Luz para Viver”), título este muito fiel ao significado da

bioluminescência, denominada “biofotogênese” no século XVII. Este livro abrange bactérias, dinoflagelados, fungos, crustáceos, conchas, lulas, medusas, peixes, vermes e insetos. Não surpreende o fato de que a bioluminescência seja mais frequente na escuridão das regiões abissais dos mares e, com raras exceções, sempre de cor azul (455-505 nm), enquanto os animais das camadas mais superficiais do mar (< 200 m) e águas costeiras emitem luz azul a verde (465-520 nm), matizando o ambiente fótico azul-esverdeado das camadas mais superficiais onde seriam camuflados, escapando eventualmente de predadores.

Hoje, define-se a bioluminescência como a emissão de luz visível fria por organismos vivos, produzida por uma reação de oxidação de uma substância sintetizada pelo próprio animal, chamada genericamente de **luciferina** (o substrato), por **oxigênio** molecular (O₂) ou, em raros casos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na presença de uma **luciferase**, nome genérico de uma enzima que catalisa a reação (Figura 3).

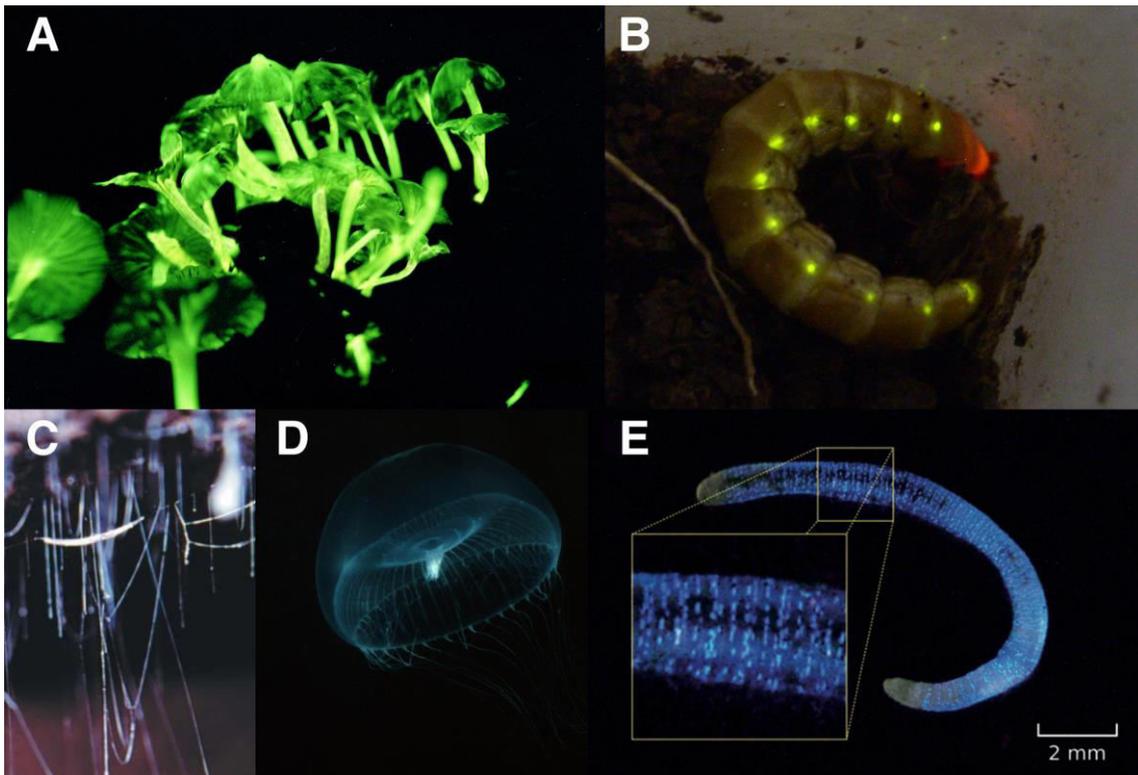


Figura 2. Exemplos de seres bioluminescentes: A, cogumelo do fungo *Mycena luentipes*, do Vale do Ribeira, SP (cortesia de Cassius V. Stevani, IQUSP); B, larva de trenzinho, *Phrixothrix heydeni* coletada na Fazenda Santa Cruz, MS.¹⁰ (copyright 1997 *Entomological Society of America*); C, larva de díptera, *Neoditomya farri*, e emissão de luz azul por outra larva à direita superior, encontrada na Jamaica¹² (copyright 2007 Wiley-VCH); D, água-viva, *Aequorea victoria* (cortesia Steven Haddock, Monterey Bay Aquarium Research Institute); E, minhoca siberiana, *Fridericia heliota*¹³ (copyright 2014 John Wiley and Sons)

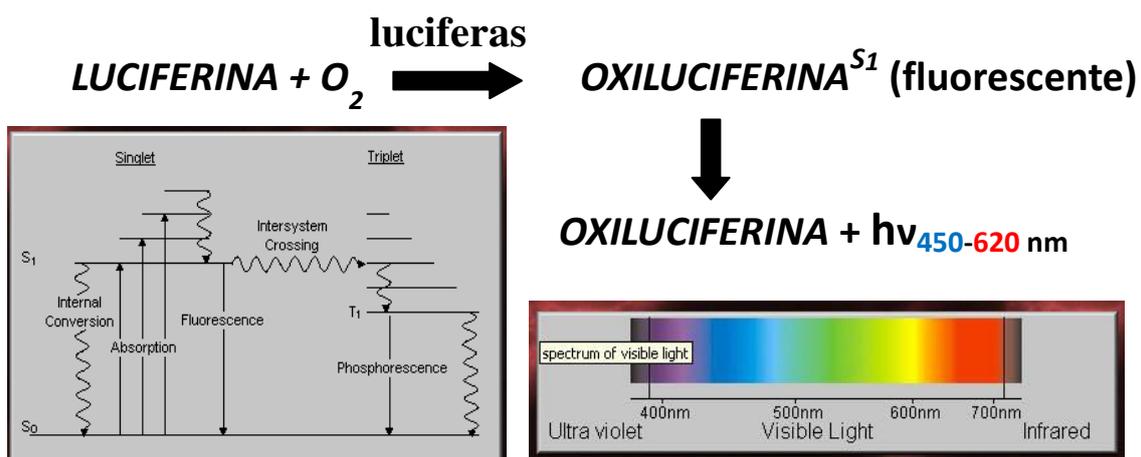


Figura 3. Equação geral da bioluminescência. A luciferina é oxidada por oxigênio gerando o produto, oxiluciferina, no estado eletronicamente excitado. Este se desativa por emissão de luz de cores que variam do azul ao vermelho. À esquerda, diagrama de Jablonski, ilustrando a excitação eletrônica de moléculas por absorção de fótons, seguida de emissão de luz fluorescente (do estado singlete, S_1) ou fosforescente (do estado triplete, T_1) de diversas cores, na dependência da energia de excitação eletrônica $\Delta(S_1-S_0)$

Lembra uma reação de combustão parcial de um combustível (a luciferina), exceto que na bioluminescência a energia das ligações químicas é convertida em fótons, em vez de liberada como calor numa chama. A luz é emitida pelo produto da reação – **oxiluciferina** – que é formada no estado fluorescente, denominado estado singlete eletronicamente excitado. As diferentes cores da bioluminescência são determinadas pela estrutura química da luciferina e moduladas principalmente pela polaridade do microambiente do sítio ativo das luciferases.^{11,14} As cores podem ainda ser modificadas por filtros óticos internos e proteínas acessórias para as quais é transferida a energia da oxiluciferina excitada. A proteína excitada é

subsequentemente desativada para o estado normal, fundamental, por emissão de fluorescência de outra cor.

Fantástico e curioso é o fato de que a bioluminescência dos besouros é produzida pela oxidação aeróbica de uma mesma luciferina, porém, resulta na emissão de cores que variam do verde (540 nm) ao vermelho (620 nm) em diferentes espécies.^{10, 14-16} O espectro de bioluminescência dos besouros luminescentes é determinado pelo espectro de fluorescência da oxiluciferina excitada (oxiluciferina*) no sítio ativo da enzima, cuja polaridade e interações com os amino ácidos de ligação do substrato e catalíticos modulam a cor e intensidade da luz emitida (Figura 4).¹⁷

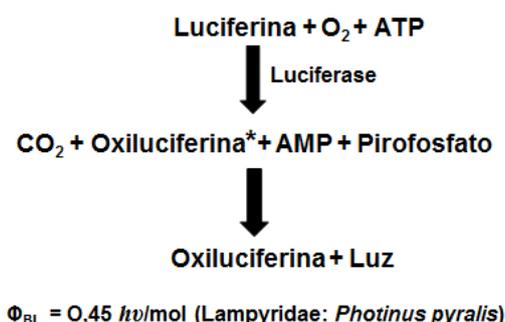
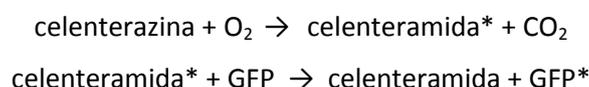


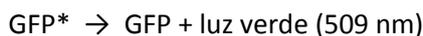
Figura 4. Equação geral da bioluminescência de besouros (vagalumes, pirilampos, trenzinhos). A reação enzimática é ativada por ATP e tem alto rendimento quântico de bioluminescência (Φ_{BL}), possibilitando o desenvolvimento de vários e sensíveis métodos analíticos dependentes do consumo de ATP. ATP é adenosina trifosfato (agente ativador), AMP, adenosina monofosfato e Φ_{BL} *in vitro* é 45% (número de fótons emitidos por molécula de luciferina oxidada)

Já no caso de celenterados, como a *Aequorea* (uma medusa, emissora de luz verde) e *Renilla* (um coral, também emissor de luz verde), a luciferina, denominada celenterazina, está associada a uma proteína (GFP, *green fluorescent protein*), para a qual

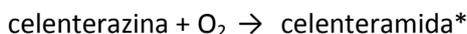
o produto excitado (celenteramida*) transfere energia resultando na GFP fluorescente que emite a luz.^{11,18} Quando fotografada no escuro, a luz é fortemente verde, mas se iluminada a cor revelada é azul, como mostrado na Figura 2.

In vivo (na presença de GFP e íons Ca^{2+}):





In vitro (na ausência de GFP):



O isolamento, identificação, clonagem, mutação e aplicações do gene da proteína GFP como repórter de expressão proteica em bioquímica, biologia celular e biotecnologia mereceram a outorga do Prêmio Nobel de Química de 2008 a Shimomura, Tsien e Chalfie, o qual foi conferencista de abertura da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) em 2009.^{19,20}

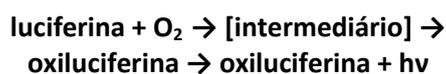
As luciferinas da maioria dos organismos bioluminescentes foram isoladas, identificadas e, algumas, sintetizadas, enquanto suas luciferases foram clonadas e inseridas no genoma de bactérias (*Escherichia coli*), as quais, portadoras de propriedade luminogênica detectável por fotomultiplicadoras ultrasensíveis, são utilizadas para marcarem e reportarem quantitativamente as propriedades de biomoléculas, poluentes, células ou mesmo organismos superiores.^{19,21} Estas enzimas encontram hoje crescente aplicação analítica em biomedicina e biotecnologia, possibilitando numerosas oportunidades de análises por imagem.²²

3. Diversidade química das luciferinas

O isolamento e elucidação da estrutura das luciferinas dos organismos bioluminescentes revelaram grande diversidade química, inclusive aldeídos como nos anelídeos *Diplocardia* e *Fridericia* e no molusco *Latia*; imidazolpirazinas em celenterados, alguns peixes, lulas e ostras; benzotiazol em vagalumes e pirilampus;

tetrapirróis lineares em dinoflagelados e crustáceos; flavinas em bactérias e possivelmente fungos; e mesmo algumas proteínas atuando como luciferinas associadas às luciferases, como no molusco *Pholas* (Figura 5).^{11,14,22} Esta variedade química de substratos sem relação estrutural entre eles, estimada em mais de trinta, sem um esqueleto carbônico ancestral, comum a todas as luciferinas, sugere que a bioluminescência emergiu várias vezes de forma descontínua durante a evolução das espécies.

Para emitir luz, todas estas luciferinas são oxidadas por oxigênio molecular ou, raras vezes outro oxidante como H_2O_2 , gerando um intermediário instável, rico em energia (geralmente um peróxido), que se decompõe imediatamente no produto luminescente.



O rendimento quântico de bioluminescência (Φ = relação entre número de fótons emitidos/número de moléculas de luciferina consumida), ou seja, a intensidade da luz emitida, depende do produto dos rendimentos das três etapas básicas consecutivas: (i) reação de formação de um intermediário “rico em energia”, (ii) formação do produto excitado (químioexcitação eletrônica) e (iii) rendimento quântico de fluorescência do produto final.¹⁹ É assim calculado pelo produto $\Phi_{\text{BL}} = \Phi_{\text{Int}} \times \Phi_{\text{QExc}} \times \Phi_{\text{F}}$. Os rendimentos de bioluminescência de vários organismos, avaliados *in vitro*, variam entre 10 e 50 %.

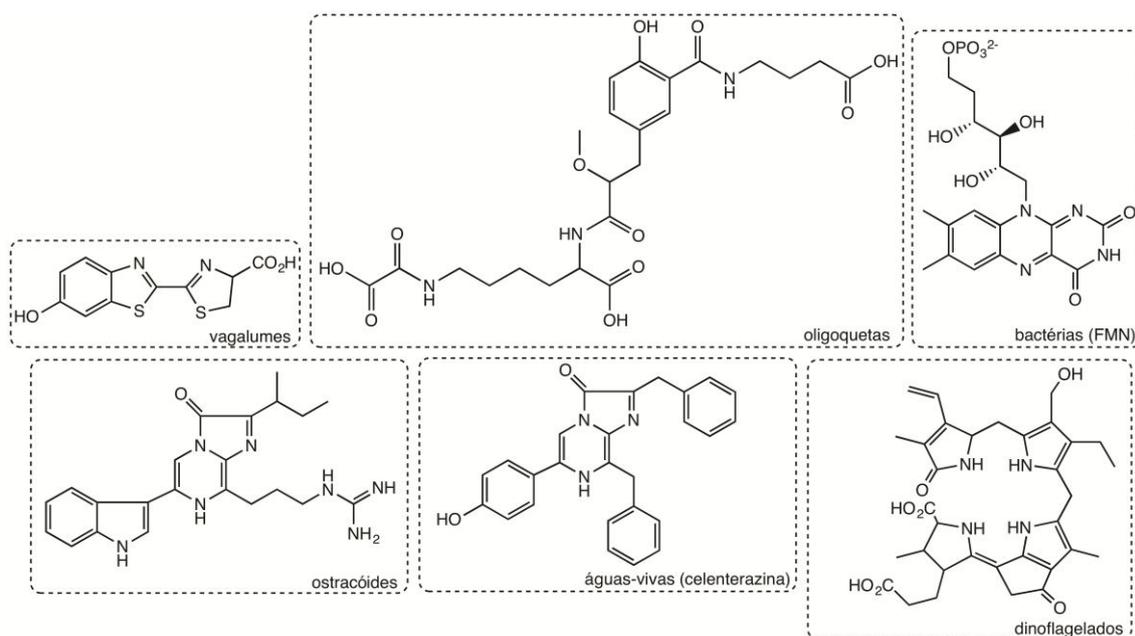


Figura 5. Estrutura das luciferinas de alguns organismos bioluminescentes

A elucidação dos reagentes, etapas e rendimento quântico da bioluminescência dos vários sistemas luciferina/luciferase consumiram muitas décadas e muito esforço, experimentação e criatividade. Muitos destes sistemas não foram completamente compreendidos até hoje, nem sequer esclarecidas as funções biológicas da emissão luminosa, como é o caso de cogumelos luminescentes. A pesquisa da bioluminescência continua a desafiar e inspirar a expertise dos cientistas e a despertar a curiosidade e encantamento das pessoas. A missão dos cientistas é desvendar ao nível molecular os mistérios da natureza. Neste contexto, vale trazer à tona a belíssima e inspiradora escultura de Barrias intitulada *Nature Unveiling Herself Before Science*, do acervo do Museum of Fine Arts de Boston (USA), em que o artista evoca o desnudamento dos mistérios da natureza pela Ciência através da remoção do manto que cobre uma formosa jovem - a Natureza (Figura 6).

Segundo Harvey,¹ foi Robert Boyle, em fins do século XVII, ao buscar entender a relação entre a *Flamma Vitalis* de animais luminescentes e o ar, percebeu que a luz

desaparecia quando expunha as lanternas excisadas ao vácuo ou ao ar “deflogisticado” (sem oxigênio) e daí estabeleceu a primeira relação de natureza química entre peixes, insetos e fungos luminescentes. Apenas dois séculos depois foi confirmado que a bioluminescência resulta de uma reação sustentada por oxigênio molecular. A descoberta dos outros ingredientes da bioluminescência - a luciferina (combustível) e a luciferase (catalisador) - veio com Raphael Dubois, em 1885.¹¹ O fisiologista francês obteve um extrato do molusco luminescente *Pholas dactylus*, livre de células, onde detectou a presença de duas proteínas, uma mais estável ao aquecimento que a outra, respectivamente, o substrato luciferina e a enzima luciferase. No mesmo ano, Dubois preparou e testou extratos frios e outros pré-aquecidos de lanternas de um pirilampo, o *Pyrophorus plagiophthalmus*.²³ O “extrato frio”, assumido conter luciferina (termoestável) e a luciferase (termoinstável) somente emitia luz, embora ainda fraca, se a ele fosse adicionado “extrato quente” rico em luciferina e luciferase inativada pelo calor. Este experimento muito simples e astuto foi o primeiro a estabelecer que a bioluminescência depende de uma luciferina

(o combustível) e um catalisador (luciferase), além do oxigênio (oxidante). Esta estratégia de preparação de “extratos frios” e “extratos quentes” para investigar o sistema luciferina/luciferase de seres

bioluminescentes é utilizada até hoje como etapa inicial da pesquisa da natureza química da bioluminescência em organismos ainda em estudo.



Figura 6. Escultura “Nature Unveiling Herself Before Science”, de Louis-Ernest Barrias, 1974. Photograph © 2014 Museum of Fine Arts, Boston

Foi só nos anos 1940 que se descobriu que, no caso da bioluminescência de vagalumes e pirilampos, e mais recentemente também das lulas luminescentes (*Watasenia japonicus*, “hotaru icá”, lula-vagalume em japonês), há a participação essencial de adenosina trifosfato (ATP) para ativação do substrato. Verificou-se que a adição de ATP a uma mistura de “extrato frio” com “extrato quente” resulta na emissão de um flash intenso de luz.¹¹ Neste ponto, é importante frisar que alguns sistemas bioluminescentes requerem a participação de co-enzimas, particularmente a nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e seu derivado fosforilado (NADPH), como é o caso de bactérias bioluminescentes e fungos.²⁴⁻²⁷ Chegamos até aqui a um conceito, ainda preliminar, da natureza bioquímica da bioluminescência, mas se pode

adiantar que este fenômeno atrai a atenção de biólogos e químicos analíticos na medida em que ATP/ADP e NAD(P)H/NAD(P)⁺ são os dois metabólitos-chave que fazem as conexões bioenergéticas e biossintéticas entre catabolismo e anabolismo das células. Justifica-se assim por que os sistemas luciferina/luciferase de vários organismos bioluminescentes têm sido crescentemente utilizados no desenvolvimento de uma lucrativa variedade de kits e métodos analíticos in vitro e in vivo para identificação, quantificação e imageamento (células, tecidos e órgãos) de eventos metabólicos que estão direta ou indiretamente associados a ATP e NAD(P)H.^{19,20,25} Graças ao alto rendimento quântico das reações bioluminescentes, se comparadas às reações quimioluminescentes, e ao desenvolvimento de fotomultiplicadoras de detecção

ultrassensíveis, comercializadas em equipamentos chamados fotômetros, luminômetros e câmaras de detecção, várias centenas de métodos e kits analíticos estão descritos hoje com base apenas nas luciferases de vagalumes, bactérias e *Aequorea*, cobrindo uma faixa de concentração de substrato que desce à escala de attomoles.

4. O sistema luciferina/luciferase e mecanismo da reação da bioluminescência de coleópteros luminescentes

A luciferina do vagalume *Photinus pyralis* foi cristalizada e estudada pela primeira vez por Bitler e McElroy (1957)²⁸ e sintetizada apenas em 1961 por White e colab..²⁹ Sua estrutura química foi identificada como a de um composto benzotiazólico derivado de D-(-

)-cisteína. Se preparada a partir de D-(+)-cisteína, a luciferina obtida é inativa. Décadas depois, reportamos a biossíntese de luciferina de larvas do pirilampo *Pyrearinus termittiluminans* a partir de cisteína marcada com átomo de enxofre radiativo (³⁵S-L-cisteína),³⁰ e mostramos^{15,16} que as luciferinas de várias espécies de elaterídeos e fengodídeos são idênticas à de lampirídeos, independentemente da cor da luz emitida, fosse ela esverdeada ou vermelha.

O mecanismo da reação bioluminescente de besouros não foi ainda satisfatoriamente esclarecido. É ainda discutível como se dá a modulação da cor do verde ao vermelho da luz destes insetos já que a luciferina é a mesma. A Figura 7 esquematiza o mecanismo geral da reação bioluminescente de vagalumes, onde a etapa de quimioexcitação eletrônica do produto fluorescente envolve a clivagem de um peróxido cíclico da classe de dioxetanonas, acompanhada da liberação de gás carbônico (CO₂).^{32,33}

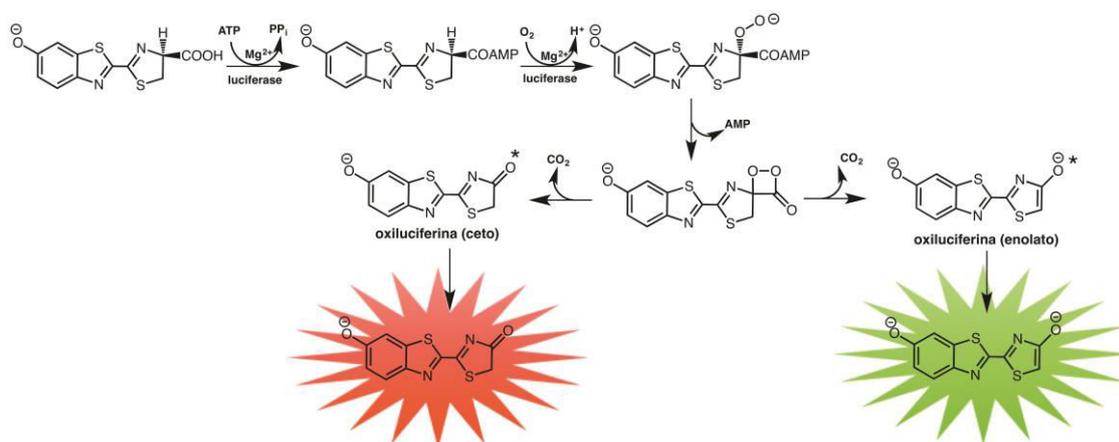


Figura 7. Mecanismo da reação de oxidação da luciferina de coleópteros luminescentes catalisada pela luciferase, com consumo de ATP e O₂

O esquema da Figura 7 indica que a luciferase atua consecutivamente como uma ligase, ao catalisar a adenilação da luciferina às custas de ATP, e uma dioxigenase, ao inserir a molécula de oxigênio na luciferina, formando um α -hidroperóxido. Este sofre ciclização a uma dioxetanona (peroxilactona) que se cliva a CO₂ e oxiluciferina excitada

(estado fluorescente). Os reagentes são os mesmos em todas as famílias de besouros luminescentes e a cor da emissão, com picos entre 520 nm, verde e 620 nm, vermelho, é modulada no sítio ativo da enzima.^{16,17}

A hipótese de formação de um intermediário rico em energia, de natureza dioxetanônica, na reação bioluminescente de

vagalumes foi esteada pela síntese da dimetildioxetanona, instável e quimioluminescente, por Adam e Liu³⁴ em 1972 e corroborada por experimentos de dupla marcação isotópica com $^{18}\text{O}_2$ e H_2^{17}O dos produtos oxiluciferina e CO_2 , realizados por Shimomura e Johnson.³⁵ Dioxetanos são peróxidos cíclicos de anel tetraatômico, portanto muito instáveis a princípio, já que se trata de compostos ciclobutânicos, com ângulos internos de 90° , ligação O-O muito fraca (32 kcal/mol) e cuja clivagem produz

duas moléculas carbonílicas muito estáveis.³⁶⁻³⁸ A Figura 8 mostra a equação geral da termólise de dioxetanos a duas moléculas carbonílicas, uma delas no estado eletronicamente excitado: predominantemente triplete (fosforescente) se contém apenas substituintes alquílicos ou singlete (fluorescentes) com substituintes RO-, RS- ou R_2N -, ou substituinte aromático com baixo potencial de oxidação.

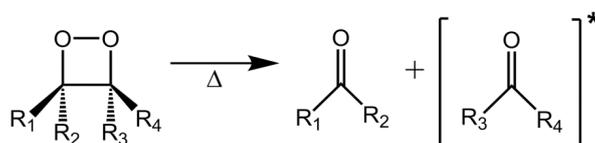


Figura 8. Decomposição térmica de 1,2-dioxetanos, gerando dois fragmentos carbonílicos, um deles no estado eletronicamente excitado

Cálculos termodinâmicos muito simples indicam que a entalpia da reação de termólise de dioxetanos localiza-se acima de 100 kcal/mol, portanto suficiente para excitar os elétrons de uma das moléculas-produto ($\ll 100$ kcal/mol) e gerar luz visível por desativação ao estado fundamental, um fenômeno conhecido genericamente como quimioluminescência. Dioxetanos com quatro grupos simples (alquílicos ou aromáticos) no anel são mais estáveis, cuja decomposição pode durar horas ou anos à temperatura ambiente, e são fracamente emissivos devido sua natureza ser predominantemente triplete (fosforescência).³⁶⁻³⁸ O primeiro dioxetano sintetizado e estudado foi o trimetildioxetano, por Kopecky e Mumford em 1969.³⁹ Dioxetanonas, os intermediários de reações bioluminescentes e quimioluminescentes (na ausência de enzimas catalisadoras), são naturalmente muito mais instáveis que dioxetanos (>20 kcal/mol versus <15 kcal/mol), devido à ligação carbonílica no anel tetraatômico, com ângulo de ligação de 120° .^{34,37} Estas descobertas dispararam pesquisas em vários países à procura de dioxetanos que tivessem altos rendimentos quânticos de

quimioluminescência, já antevendo a elucidação de mecanismos de várias reações quimio- e bioluminescentes e suas aplicações analíticas, inclusive como ferramentas para substituição de radio-imunoensaios por lumimunoensaios, mais baratos e seguros.¹⁹

Até os fins dos anos setenta já se sabia que a cor e intensidade da emissão de vagalumes eram sensíveis ao pH, força iônica, presença de cátions divalentes, temperatura e polaridade do meio.¹⁴ Todos estes fatores são determinantes da estrutura tridimensional e atividade de proteínas, portanto, também das luciferases. Foi inicialmente proposto que, no microambiente do sítio ativo da enzima, a energia de quimioexcitação eletrônica da oxiluciferina, residente no intermediário dioxetanônico hipotético, seria particionada entre duas formas possíveis de oxiluciferina-produto: uma monoaniônica (cetônica, mais propriamente amídica) e outra dianiônica (enolato) (Figura 7).³² A fluorescência da forma cetônica tem cor vermelha e aquela do enolato, amarelo-esverdeado. A polaridade do microambiente do sítio ativo, determinada pelos resíduos de amino ácidos e conteúdo de água, afetariam mais

sutilmente a cor emitida em direção ao amarelo ou laranja.

A exigência de desprotonação do grupo fenólico da porção benzotiazólica da luciferina para emissão de luz já havia sido demonstrada pelo colapso da bioluminescência por prévia metilação deste grupo. Esta observação foi interpretada pela necessidade de transferência intramolecular de elétron do fenolato para o anel dioxetânico, desestabilizando-o ainda mais, para ocorrência da excitação da oxiluciferina, segundo a hipótese mecanística de quimioluminescência cunhada por Schuster como “*chemically initiated electron exchange chemiluminescence (CIEEL)*”.⁴⁰

As luciferases de vagalumes catalisam inicialmente a lenta adenilação do grupo carboxílico da luciferina ligada ao sítio ativo da enzima às custas de ATPMg²⁺, com liberação de pirofosfato, seguida de rápida remoção de próton ao carbono alfa da carboxila, inserção da molécula de oxigênio ao carbânion resultante formando um alfa-hidroperóxido, o qual é ciclizado à dioxetanona por ataque nucleofílico à carbonila com deslocamento de AMP e clivagem imediata do intermediário peroxidico à oxiluciferina no estado fluorescente e CO₂ (Figura 7).³⁶ Isto posto, como já mencionado, constata-se que a luciferase tem o duplo papel de uma ligase dependente de ATP e de uma dioxigenase.

A modulação da cor através de uma conversão cetoenólica da oxiluciferina excitada sofre, entretanto, severas críticas até hoje:¹¹ (i) a dimetilação do carbono vicinal à carbonila da oxiluciferina impediria sua enolização, no entanto a luciferina correspondente continua luminogênica na região do verde; (ii) o perfil de pH da distribuição espectral da bioluminescência mostra sempre dois picos, em que apenas o emissor verde é sensível ao pH, o que exclui equilíbrio químico entre as duas formas; (iii) a formação prévia da ceto-oxiluciferina, emissora de fluorescência vermelha, para ser convertida na forma excitada do enolato, emissor de luz maior energia, de cor verde-amarelada, requer energia eletrônica

adicional. Outra proposta para explicar a modulação da cor emitida pela luciferases das três famílias de coleópteros bioluminescentes, ignorada atualmente, foi formulada a partir de cálculos computacionais. Apelava para distorção do ângulo entre os dois anéis – o benzotiazólico e o tiazólico – comprometendo a coplanaridade dos anéis aromáticos e, portanto, seu espectro de bioluminescência.

A descoberta de que as luciferases nativas de lampirídeos são sensíveis ao pH, enquanto as de elaterídeos e fengodídeos não o são e estudos de mutagênese e engenharia genética realizados na última década no Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Sistemas Bioluminescentes (UFSCAR, SP) com luciferases clonadas a partir de mais de 10 espécies brasileiras de lampirídeos, fengodídeos e elaterídeos, revelaram vários resíduos e regiões da estrutura tridimensional das luciferases que modulam as cores de bioluminescência.^{16,17,41-43} As luciferases oriundas de diferentes famílias de besouros são proteínas com 542-550 resíduos de aminoácidos. Elas compartilham entre 45-50 de identidade na sequência de aminoácidos (estrutura primária). Dentro da mesma família de vagalumes, as luciferases têm um grau de identidade que varia de 60-99%, com massa molecular cerca de 60 kD. Identidade é definida pelo número de aminoácidos idênticos em relação ao número total de aminoácidos. No conjunto, estes resultados mostram que ligeiras mudanças na conformação do sítio-ativo das diferentes luciferases, causadas por diferentes aminoácidos, afetam a entrada de água e as interações de resíduos de aminoácidos básicos em torno do grupo fenol da oxiluciferina, modulando a cor da luz do verde ao vermelho (Figura 8). Em outras palavras, as luciferases têm dois domínios interligados por uma alça com oito aminoácidos, com um ângulo entre as duas cadeias polipeptídicas que determina o grau de polaridade do microambiente do sítio ativo que elas formam (teor de água) e proximidade de resíduos básicos. Ângulo

mais aberto, abrigando mais moléculas de água, favorecem a “ceto”-oxiluciferina excitada, emissora de luz vermelha, e ângulo mais fechado, portanto ambiente mais hidrofóbico, beneficiam a “enol”-oxiluciferina excitada, com fluorescência verde-amarelada

(Figura 9). Estes estudos resultaram em considerável avanço na compreensão do mecanismo de modulação da cor pelos insetos.

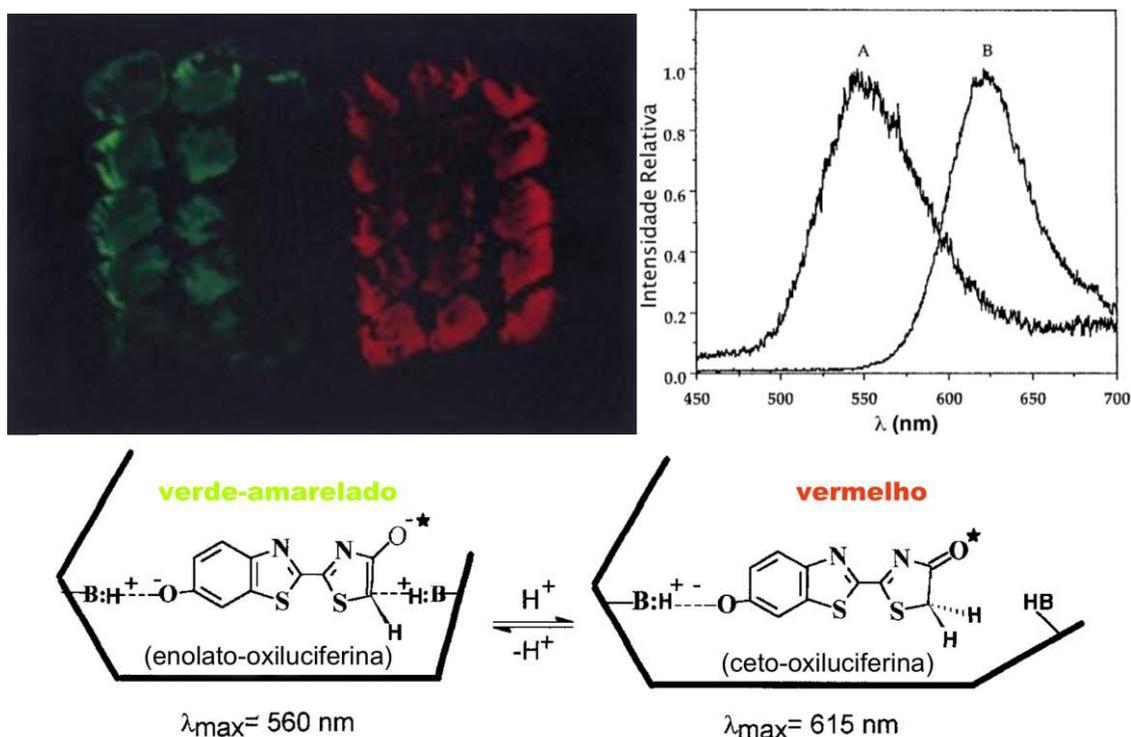


Figura 9. Mecanismo de modulação da cor da bioluminescência de coleópteros bioluminescentes. Painéis: Colônias de bactérias (*Escherichia coli*) transformadas com os cDNAs das luciferases das duas lanternas de *Phrixothrix heydeni* (Phengodidae); espectros de bioluminescência das duas colônias de bactérias expressando as luciferases “verde-amarelada” e “vermelha”; e hipotética conversão ceto-enólica entre forma cetônica (fluorescência vermelha) e enólica (verde-amarelada) no sítio ativo da luciferase, assistida por resíduos de aminoácidos básicos.¹⁷ Copyright 1999 American Chemical Society

5. Ligases versus luciferases: Uma proposta para a evolução da bioluminescência

O mecanismo de ação da luciferase assemelha-se muito às reações de formação da ligação peptídica de proteínas e da ligação de ácidos graxos a glicerol nos triacilgliceróis, catalisadas por ligases (Figura 10).⁴⁴⁻⁴⁶

Em ambos os casos – luciferase e ligase –,

o papel do ATP é ativar a carboxila na forma de um adenilado (anidrido misto), um excelente grupo de partida em ataques nucleofílicos: à carbonila no caso da luciferase, ou um tioéster nos casos de proteínas e gliceróis, também um excelente grupo de saída ao ataque do α -aminogruppo do aminoácido a ser inserido na cadeia crescente do peptídeo, ou do grupo hidroxila do glicerol receptor do grupo acila.⁴⁵ A propósito, em anos recentes foi relatada a ação catalítica de luciferase sobre a acilação de glicerol por ácidos graxos, permitindo o

desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de ácidos carboxílicos e triacilgliceróis em soro.⁴⁷ Assim, o mecanismo descrito de ação de luciferases sobre a luciferina, um ácido carboxílico, assemelha-se

àquele da síntese de triacilgliceróis e é consistente com o alto grau de homologia entre a luciferase de insetos e as ligases (também chamadas de ATP sintetases) de microorganismos, plantas e mamíferos.

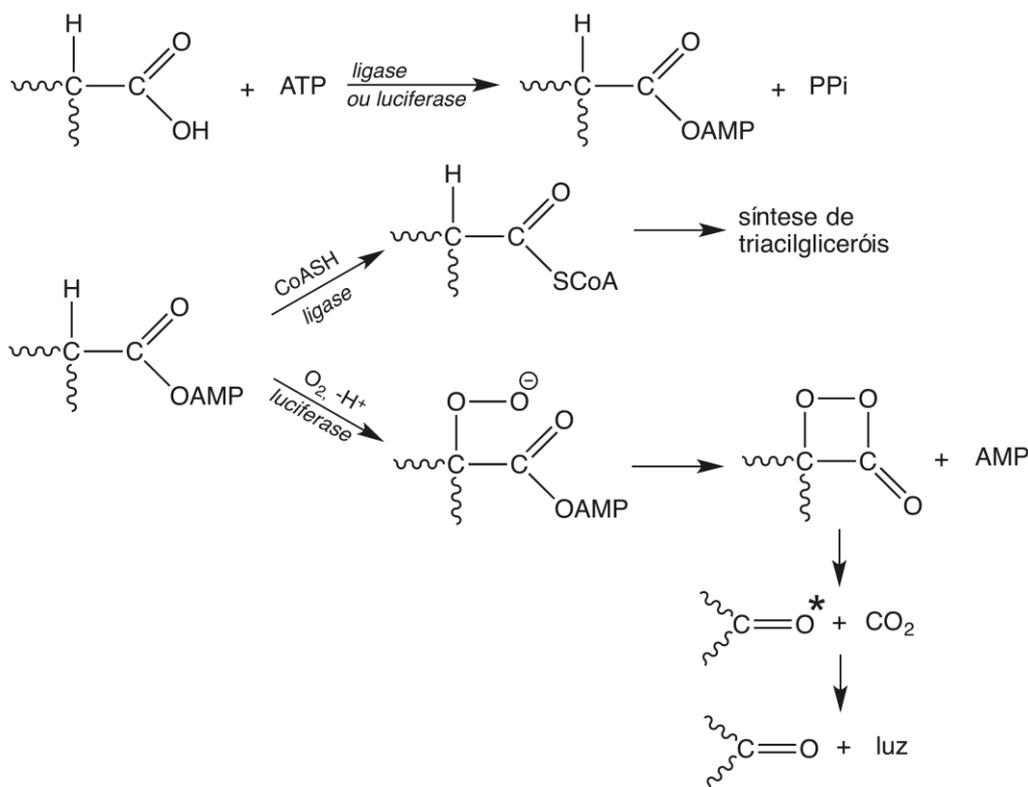


Figura 10. Reação de acilação de glicerol por ácidos graxos catalisada pelo complexo da triacilglicerol sintetase ou pela luciferase de vagalumes. ATP, adenosina trifosfato; AMP, adenosina monofosfato; PPI, pirofosfato

Considerando-se a similitude estrutural e funcional de luciferase e ligase, Viviani e Bechara⁴⁴ testaram o efeito da **injeção de luciferina de vagalume em larvas do coleóptero não luminescente *Tenebrio molitor*** (Tenebrionidae) com o fim de, eventualmente, validarem a hipótese de que ligases deste besouro pudessem responder à oferta do substrato luminescente quimicamente adequado, já que a luciferina é um ácido carboxílico e seu produto de oxidação é fluorescente. Sim, **o corpo da larva emitiu fraca luz vermelha** e seus extratos totais brilharam à adição de concentrações crescentes de ATP e luciferina ao meio reacional. Recentemente o grupo do

Prof. Viviani e colaboradores na UFSCAR clonaram o cDNA que codifica esta enzima *luciferase-like*, e investigaram sua estrutura e função. Concluíram que a atividade oxigenásica das luciferases teria evoluído posteriormente à atividade ligásica mediante mutações (mudança de aminoácidos constituintes do sítio-ativo) nesta enzima.⁴⁶ Esta descoberta permitiu também, através de técnicas de engenharia genética, desenvolver uma luciferase totalmente nova a partir de uma ligase. Imaginamos então que qualquer outro substrato carboxílico cujo produto de oxidação fosse fluorescente e substrato de luciferase poderia alimentar uma reação enzimática luminescente na presença de ATP,

devido à presença ubíqua de ligases em células. Ou seja, as ligases seriam assim “proto-luciferases”, as enzimas ancestrais das luciferases que se converteram em oxigenases/luciferases ao adquirir a propriedade de catalisar a oxidação luminescente de um substrato “proto-fluoróforo” por oxigênio molecular.

6. Comunicação sexual nos coleópteros luminescentes

A atração, corte e cópula de vagalumes são espécie-específicas. São raros os encontros sexuais mal-sucedidos, mas quando acontecem podem ser fatais aos machos. Deve-se ao biólogo americano James Lloyd (Universidade da Florida, Gainesville) a maior parte do que se conhece sobre os padrões de atração e corte sexual destes insetos, inclusive as respectivas posições de cópula determinadas ao flagrar e imobilizar os pares com cera derretida, seguido de cortes anatômicos que desenharam a monta sexual.^{3,11} Há diferentes padrões de interação sexual, como, por exemplo: a fêmea é sedentária, pousada sobre a vegetação, e pisca para o macho, atraindo-o, como no caso de vagalumes do gênero *Lampyrus*; ou é o macho em vôo que sinaliza e atrai a fêmea, como nos vagalumes dos gêneros *Photinus*, *Aspisoma* e algumas *Luciola*. Nuvens de machos e fêmeas de *Pteroptyx* no sudeste da Ásia sincronizam seus sinais, inspecionam e competem pelos parceiros. Milhares de machos deste gênero pousam em árvores para que, possivelmente, seus sinais sincronizados e coletivamente intensos atraiam a atenção das fêmeas.¹¹ A sincronização de sinais também é observada em algumas espécies americanas e constituem atrações turísticas. A cor (550 a 580 nm), intensidade (número e tamanho das

lanternas), frequência (período de 1 a 10 segundos) e duração dos flashes (milissegundos) e padrão de vôo nupcial são características de cada espécie. Machos de certas espécies competem entre si pelas fêmeas e fêmeas de outras selecionam os machos para a cópula. Em outras, vários machos se amontoam entre pares engajados no ato sexual na tentativa de conquistar-lhes as fêmeas ou mesmo confundir os rivais com pseudo-flashes característicos de fêmeas. Há ainda *femmes fatales* de *Photinus*, *Photuris*, *Pyroctomena* e *Robopus* que imitam os flashes de fêmeas de outras espécies, atraindo os respectivos machos para devorá-los em seguida.

Evidentemente, a descrição de padrões tão complexos de comunicação sexual seria confiável apenas se se demonstrasse que o espectro de bioluminescência recobre pelo menos parcialmente o espectro de sensibilidade ótica do inseto, ou seja, ele “vê” a luz emitida pelo parceiro sexual, e se a corte ocorre apenas se o inseto é estimulado para a cópula durante o vôo. Ou seja, se há controle neural do sinal luminoso... o inseto “quer” se reproduzir! Experimentos provaram que estes requisitos são atendidos. Há muito se sabe que o vagalume perde a capacidade de emitir luz quando decapitados, embora suas lanternas ainda contenham luciferina, oxigênio, ATP e luciferase ativa, ou seja, há controle neurológico,³ hormonal, como será discutido posteriormente. Por outro lado, recentemente demonstramos que o eletrorretinograma do elaterídeo *Pyrophorus punctatissimus* coincide com os espectros de bioluminescência de suas lanternas: verdes das duas lanternas protorácicas e alaranjada da lanterna ventral, exposta apenas durante o vôo nupcial ou quando manipulados⁴⁸ (Figura 11). Insetos não luminescentes enxergam apenas luz ultravioleta. Portanto, o pirilampo vê a luz emitida pelo seu parceiro sexual.

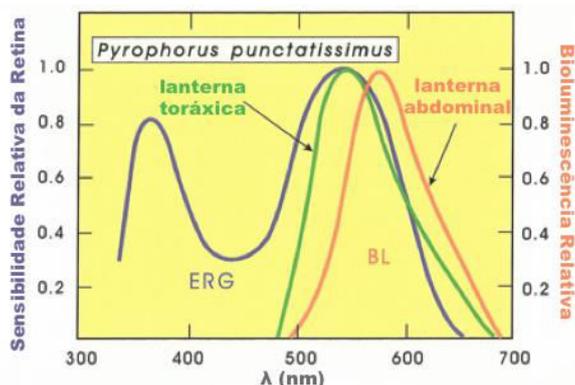


Figura 11. Eletroretinograma (linha azul) e espectro de bioluminescência das lanternas torácicas (linha verde) e abdominais (linha laranja) do elaterídeo *Pyrophorus punctatissimus*. A superposição do espectro de sensibilidade ótica com os espectros de emissão de luz confirma que ambas as lanternas devem participar da atração e corte sexual destes insetos. Adaptada da ref. 48. Copyright Springer 2010

7. Quanto oxigênio é consumido para emissão de flashes?

Outra questão fundamental – a disponibilidade de oxigênio na lanterna em concentração suficiente para sustentação do *flash* – foi resolvida parcialmente com a descoberta do papel do NO (óxido nítrico para os biólogos e monóxido de mononitrogênio para os químicos) neste processo. O óxido nítrico é um gás que foi identificado em 1987 como o “fator relaxante derivado do endotélio” (EDRF, de *endotelium-derived relaxing factor*) que controla a pressão arterial, independentemente por Ignarro e por Moncada em 1987,^{49,50} mas só o primeiro foi laureado com o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1998. Este gás controla a pressão sanguínea através do relaxamento das camadas musculares subadjacentes aos vasos sanguíneos e muitas outras funções fisiológicas, inclusive sustenta a ereção peniana. Assim foi explicado o mecanismo de flash do vagalume *Photuris* sp. por Trimmer:⁵¹ O estímulo da proximidade do parceiro sexual libera um neurotransmissor – a octopamina – que induz a ativação da óxido nítrico sintase (NOS) nos terminais nervosos junto às traquíolas, terminais da traqueia. O NO liberado pela enzima difunde-se em

direção aos fotócitos, onde se liga fortemente à citocromo oxidase das mitocôndrias, numerosas nos fotócitos, deslocando o oxigênio molecular coordenado ao íon férrico da enzima e interrompendo a cadeia respiratória. Conseqüentemente, há um pico de alta concentração de oxigênio molecular que dispara seu imediato consumo pelo sistema luciferina/luciferase dos fotócitos e conseqüente produção de fótons. Esta hipótese, entretanto, não resiste a várias críticas, entre elas:⁵² (i) a interrupção do transporte de elétrons pelo NO também cessaria a produção do ATP, necessário à adenilação da luciferina, fase lenta da reação bioluminescente; (ii) a constante de ligação e NO e de O₂ ao íon de ferro da citocromo oxidase é praticamente mesma o que implica em alta concentração de NO para competição efetiva com O₂, embora tenha sido demonstrado cineticamente que a inibição da citocromo oxidase é favorecida por alta relação O₂/NO; (iii) o NO é livremente difusível em todas as direções e deveria relaxar o calibre de outras estruturas dos fotócitos, alterando o fluxo de O₂ nos tecidos; (iv) larvas de vagalumes emitem luz verde continuamente durante vários segundos, não flashes, para atração de presas, bem como as lanternas torácicas de pirilampos e as laterais de trenzinhos para atração sexual; (v) ovos e pupas de elaterídeos emitem luz continuamente; e (v) não foi explicado como

se dá a ativação da NOS por octopamina. Na atividade farmacológica do óxido nítrico baseia-se o Viagra,⁵³ um dilatador dos vasos do tecido cavernoso do pênis, facilitando seu intumescimento, daí um artigo da *Folha "Ciência" de São Paulo* ter chamado o óxido nítrico de "Viagra dos vagalumes".

Quanto de oxigênio é consumido pelo

inseto para a emissão de luz? Esta é uma questão relevante frente ao fato de que seu destino principal é certamente a produção de ATP na respiração e outra fração é utilizada para oxidação de vários metabólitos, catalisada por monoxigenases dependentes de NAD(P)H e dioxigenases (Figura 12).

Processos	Produtos
Respiração (> 85%)	H₂O, CO₂, ATP, Calor
Oxigenases	H₂O₂ (O₂^{•-}, HO[•], ROOH)
Bioluminescência (? %)	CO₂, luz

Figura 12. Destinos biológicos do oxigênio molecular inalado por organismos bioluminescentes: respiração, produção de espécies reativas de oxigênio (radicais e peróxidos) e bioluminescência

Recebidos pelo *EPR Center for the Study of Viable Systems* da Dartmouth Medical School (NH, USA), determinamos, via ressonância paramagnética de elétron (EPR), a queda da concentração de oxigênio na lanterna torácica de uma larva do pirilampo *Pyrearinus termitiluminans* durante a emissão de luz, ao ser provocada com a oferta às suas mandíbulas de um exemplar de cupim-operária, sua presa predileta nos cerrados do Brasil central (Figura 13).⁵⁴

Esta técnica *in vivo* é baseada no efeito amplificador de oxigênio molecular da largura da banda do radical ftalocianina de lítio, cujos cristais foram pré-microinjetados na lanterna da larva. A largura da banda de EPR responde linearmente à concentração

local do oxigênio, uma vez que o oxigênio molecular é um diradical (tripleto) e interage com o radical ftalocianina. Tão logo a larva foi estimulada pela oferta de uma cupim-operária, ela acendeu sua lanterna torácica e constatou-se uma queda imediata de cerca de 18% do oxigênio na lanterna, que foi restaurado lentamente ao longo de pelo menos cinco minutos. Além disso, verificamos que a difusão do oxigênio na fase gasosa requer cerca de 600 milissegundos, enquanto nos tecidos (fase aquosa) demanda 1300 segundos, sugerindo que a modulação dos níveis de oxigênio nos fluidos da traqueia é o mecanismo que controla a mobilização de oxigênio para as lanternas.

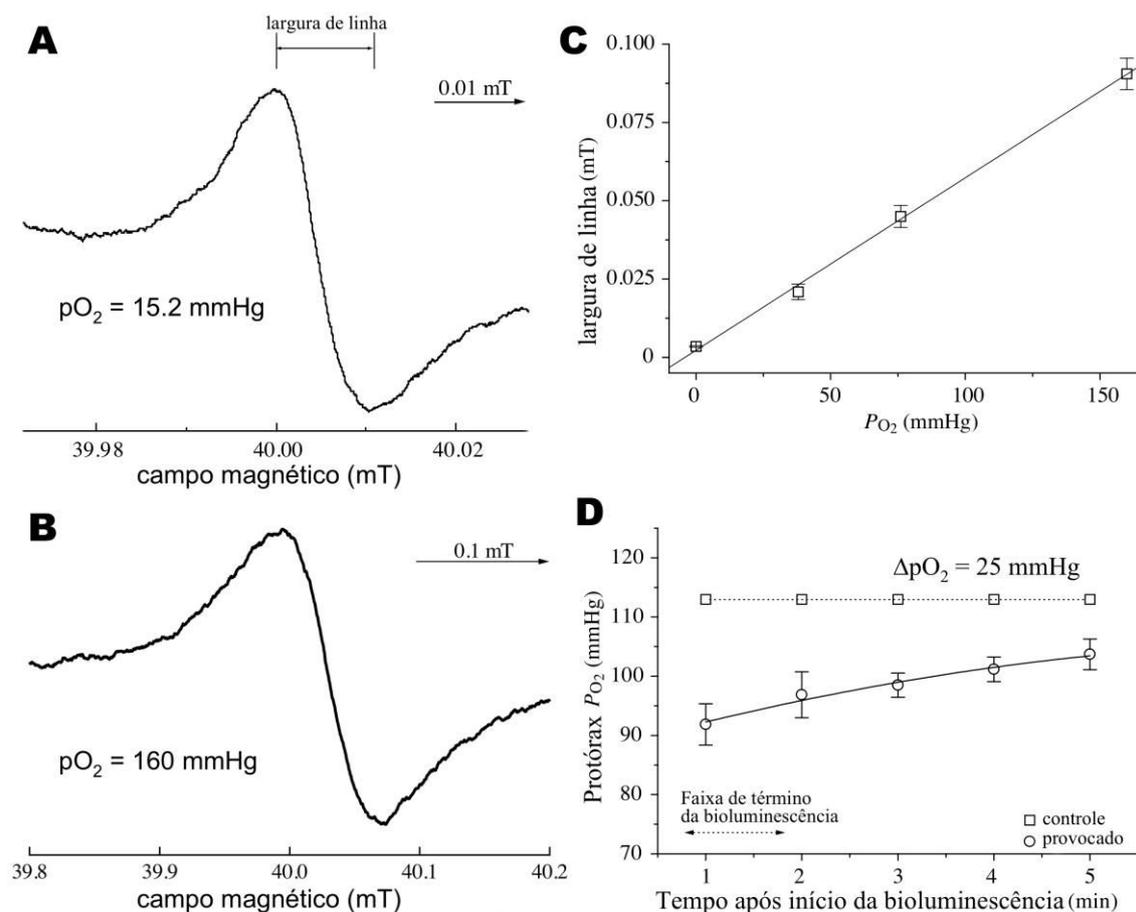
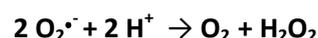


Figura 13. Avaliação *in vivo* por EPR do consumo de O_2 por larvas de *Pyrearinus termitilluminans* durante emissão de luz. Adaptado da ref. 54, sob licença da Company of Biologists Subscription Journals

8. A bioluminescência funciona como mecanismo auxiliar na desintoxicação do oxigênio?

A partir da descoberta de McCord e Fridovich (1969) de que as cupreínas, proteínas ubíquas em seres aeróbios, tidas como estocadoras celulares de cobre, também catalisam a dismutação de um radical livre – o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) – caiu por terra o tabu de que radicais não são produzidos *in vivo*.⁵⁵ Estas proteínas foram denominadas superóxido dismutases (SOD) e seus produtos identificados como oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2):



A proposta da ocorrência e papéis de radicais livres em sistemas biológicos era até então desacreditada, frente ao fato de que os radicais orgânicos identificados até então eram geral e inespecificamente reativos. Havia a crença de que, dada à alta reatividade e baixa seletividade química de radicais e ao fato de que H_2O_2 reage com íons de Fe^{2+} produzindo radical hidroxila (HO^{\cdot}), altamente eletrofílico e reativo, o oxigênio molecular era uma faca de dois gumes: provia simultaneamente vida e degeneração, ao causar lesões químicas comprometedoras da estrutura e função de biomoléculas essenciais (proteínas, DNA, lipídios, carboidratos). Sabia-se, entretanto, que, em

contrapartida, enzimas antioxidantes como a própria SOD e a catalase e peroxidases consumidoras de H₂O₂, além de moléculas antioxidantes de baixo peso molecular (tocoferol, ascorbato, carotenoides, bioflavonoides, etc.), são capazes de prevenir a formação desses radicais ou sequestrá-los

(Figura 14).⁵⁶ Experimentos posteriores à descoberta das SOD mostraram a indução de altos níveis destas enzimas como resposta protetora, adaptativa, a desafios de células ou animais-modelo com oxigênio puro ou substâncias produtoras de radical superóxido (pró-oxidantes).

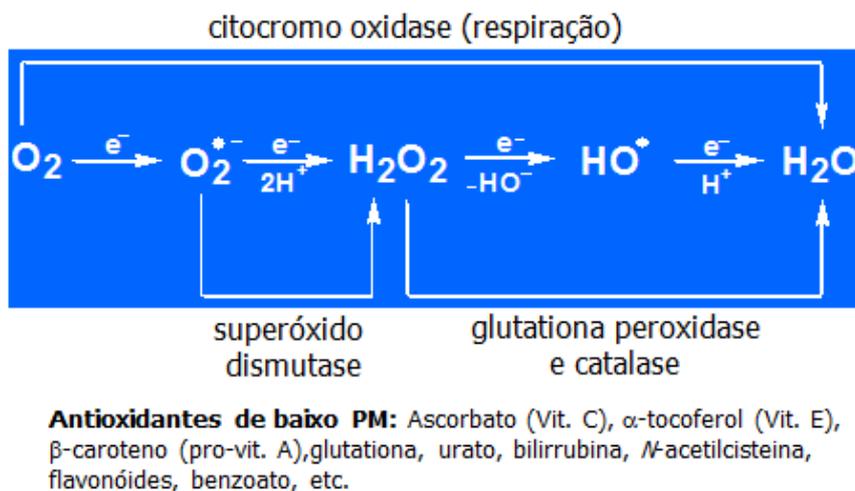


Figura 14. Redução parcial de oxigênio em etapas unieletrônicas, gerando sucessivamente o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila, extremamente eletrofílico, e finalmente água. Enzimas e moléculas menores atuam como antioxidantes garantindo o balanço redox celular adequado à homeostase, uma vez que as denominadas espécies também participam de eventos biológicos cruciais ao ciclo celular

Outras proteínas e enzimas podem ainda reparar os danos químicos causados por radicais às biomoléculas, restaurando sua atividade. Este delicado e crucial balanceamento entre produção e consumo de espécies altamente oxidantes (*e.g.*, radicais, peróxidos, oxigênio singlete, hipoclorito, etc.) nos tecidos de organismos vivos, ou seja, a relação entre espécies pró- e antioxidantes, costuma ser denominado “estresse oxidativo” ou, mais propriamente, “balanço redox”. Mais recentemente, demonstrou-se que tais espécies não são necessariamente tóxicas ao organismo; ao contrário, são essenciais à sua proteção, por exemplo, ao oxidar e inativar bactérias invasoras durante sua fagocitose por macrófagos e ao participar de vias sinalizadoras de eventos celulares vitais ao

organismo.⁵⁷

Em virtude destes fatos, muitos autores propuseram no passado que a bioluminescência poderia ter surgido durante a evolução como uma válvula de escape para eliminação de certa fração “tóxica” do oxigênio, contribuindo assim com a superóxido dismutase e outras enzimas antioxidantes para manutenção de um balanço redox saudável aos seres bioluminescentes.⁵⁸ Esta hipótese foi refutada por Swartz⁵⁹ com o argumento de que, ao longo da evolução, quando a concentração de oxigênio no ambiente alcançou altos níveis, o consumo deste oxigênio “fútil” teria se tornado bioenergeticamente muito custoso e os organismos teriam buscado outras vias de desintoxicação do oxigênio, inclusive os

insetos. Mesmo assim, decidimos insistir na validação da hipótese de cooperação entre luciferase e SOD para manter níveis adequados de oxigênio e de seu produto radical superóxido nas lanternas dos coleópteros luminescentes.

Coletadas nos cupinzeiros e estocadas individualmente em potes plásticos contendo porção de terra das imediações dos cupinzeiros, larvas de *Pyrearinus termitilluminans* foram transportadas para o laboratório no IQUSP, onde foram alimentadas com operárias de cupins, para observação e estudos bioquímicos.

O conjunto dos resultados descritos a seguir corrobora a noção de que a bioluminescência de insetos pode ter surgido durante a evolução como um mecanismo auxiliar de desintoxicação do oxigênio em diferentes habitats e apropriada pelos insetos para comunicação intra- e interespecífica e reprodução.

(i) A pergunta inicial era se havia alguma diferença nos níveis enzimáticos de SOD em coleópteros luminescentes e não-luminescentes. Constatou-se que extratos totais de larvas do elaterídeo bioluminescente *Pyrophorus divergens* têm, de fato, cinco vezes maior atividade de SOD do que os extratos de larvas dos elaterídeos *Chalcolepidus*, *Ischiodontus*, *Platycrepidus* e *Conoderus*, todos eles sem luz própria.⁶⁰ Por outro lado, larvas do elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans*, residentes de túneis normalmente aerados escavados em cupinzeiros (~20% de oxigênio), contêm níveis de SOD três vezes mais elevados que os elaterídeos *Pyrearinus candens* e *P. candelarius*, também luminescentes, cujas larvas vivem em túneis construídos dentro de troncos apodrecidos, onde a pressão parcial de oxigênio é de apenas 2-5%. Portanto, a resposta à pergunta inicial foi positiva: pirilampos luminescentes são mais ricos em SOD que seus “primos” não luminosos. A disponibilidade de oxigênio no habitat reproduz experimentos antigos com animais de laboratórios, e mesmo microorganismos facultativos, expostos a altas concentrações

de oxigênio, nos quais foi constatada indução protetora de SOD.

(ii) Como as larvas de *P. termitilluminans* emitem luz mais intensa no protórax e mesotórax e menos intensas nos dois últimos segmentos abdominais do que nos oito primeiros segmentos abdominais, os quais são pouco luminogênicos, a interrelação intensidade de luz *versus* nível de SOD foi comprovada medindo-se os níveis da SOD ao longo do corpo da larva: as atividades de SOD foram duas vezes superiores nos segmentos brilhantes, tanto torácicos como abdominais.⁶⁰

Outro teste realizado foi a comparação dos níveis das enzimas luciferase, SOD, catalase, citrato sintase e luciferina, entre outras, em larvas de *P. termitilluminans* submetidas à normóxia (ar) e hiperóxia (100% de oxigênio puro durante 3 dias) (Tabela 2).⁶¹ O resultado final corroborou a hipótese de trabalho: sob hiperóxia, as atividades de CuZnSOD (citoplasmática) e MnSOD (mitocondrial) foram cerca de duas vezes maiores e aquelas de catalase, luciferase e luciferina 50% mais altas. Não se constatou alteração das atividades de citrato sintase mitocondrial (respiração) e lactato desidrogenase (glicólise), mas houve redução da atividade de succinato desidrogenase, sugerindo que a resposta metabólica ao ambiente com oxigênio puro ateu-se à bioluminescência e à produção excessiva de radicais superóxido. Além disso, ao acompanhar as atividades da SOD diuturnamente durante três dias, verificamos que o pico de atividade enzimática antecede em horas o pico de emissão luminosa, sugerindo preparação dos fotócitos para dar cabo da produção excessiva de superóxido durante a bioluminescência.⁶²

Estes três experimentos autenticam a noção de que luciferases podem ser coadjuvantes de SODs na proteção das lanternas dos insetos luminescentes contra produção excessiva de radicais e outras espécies oxidantes geradas pelo oxigênio molecular.

Tabela 2. Marcadores de metabolismo radicalar e bioluminescência no protórax e abdomen de larvas de *P. termitilluminans* expostas durante 72 horas em câmara com oxigênio puro.⁶¹ SOD, superóxido dismutase (CuZnSOD, citoplasmática; MnSOD, mitocondrial); GSPx, glutathiona peroxidase. (a) unidades de atividade/mg proteína; (b) unidades de luz/mg proteína. Uma unidade de luz produz um pico biometricamente equivalente a 0.02 μCi de ^{14}C em coquetel cintilante de PPO/POPOP; (c) nmol/mg protórax. ND, Não detectável. (*) $p < 0.01$. Tabela adaptada da ref. 61. Copyright 1998 Elsevier

Enzima	Protórax		Abdômen	
	Controle	Exposição	Controle	Exposição
SOD Total ^a	33 \pm 9	61 \pm 2*	16 \pm 3	27 \pm 11*
CuZnSOD ^a	18 \pm 8	27 \pm 10	5 \pm 2	11 \pm 5*
MnSOD ^a	15 \pm 5	34 \pm 12*	10 \pm 3	16 \pm 2*
Catalase ^a	33 \pm 1	50,2 \pm 0,3*	22 \pm 2	23 \pm 1
GSPx ^a	3,2 \pm 0,4	2,8 \pm 0,3	4,5 \pm 0,5	5 \pm 1
Luciferase ^b	2,0 \pm 0,3.10 ⁶	3,6 \pm 0,5.10 ⁶ *	7,9 \pm 0,5.10 ²	9 \pm 2.10 ²
Luciferin ^c	1,6 \pm 0,4	2,3 \pm 0,2	ND	ND

9. Os cupinzeiros luminosos do cerrado

Na região do Parque Nacional das Emas (PNE, GO), localizado na confluência com os estados de MT e MS (Brasil), onde estão as nascentes dos rios Taquari, que deságua no Pantanal, rio Araguaia, afluente do Amazonas, e Formoso, tributário do rio Paraná e onde viveram tribos de Caapós, o cerrado apresenta um dos fenômenos mais magníficos e grandiloquentes da bioluminescência do planeta: os campos de cupinzeiros luminosos (Figura 1).^{63,64}

Estes termiteiros suplantam em beleza e tamanho (i) a “Baía Fosforescente” de San

Juan de Puerto Rico, com ondas brilhantes azuis (bioluminescência de dinoflagelados); (ii) os grandes cardumes de “peixes-lanternas” (*Photoblepharon* sp), formando grandes manchas luminosas verdes do Mar Vermelho; e (iii) os tetos de cavernas da Nova Zelândia (*Waitomo Caves*) pontilhados de pequenas luzes azuis (*glow worms*) emitidas por larvas da díptera *Arachnocampa*.¹¹ Infelizmente, nossos cupinzeiros luminosos estão sendo extintos nos cerrados pela agricultura mecanizada e nem sequer foram suficientemente explorados turisticamente, com benefícios econômicos à população local, como são os casos da Baía Fosforescente e as Cavernas de Waitomo.



Figura 15. Campos de Cupinzeiros do Cerrado (1988). Foto de Roberto Bandeira (Arquivo Etelvino Bechara) na Fazenda Santo Antônio, Município de Mineiros, GO. Abaixo: Trabalho de campo, ao entardecer, com remoção de pedaços de cupinzeiro com picareta para posterior coleta manual de larvas e às vezes serrote, para moldagem dos túneis (larvas) e câmaras (cupins) com poliestireno. Ao fundo, vê-se a Kombi para transporte da equipe e materiais de coleta e, do outro lado da cerca, o campo já preparado para plantio da soja – prenúncio da devastação do cerrado e extinção dos cupinzeiros luminosos

Foi no PNE e fazendas vizinhas que, durante mais de vinte anos, com o suporte científico de pesquisadores do Museu de Zoologia da USP (Dra. Cleide Costa) e Instituto de Biociências da USP (Prof. Sérgio Vanin), estudamos o elaterídeo *Pyrearinus termitilluminans* descrito por Costa como

inquilino dos cupinzeiros na sua fase larval.⁶³ Havia relatos prévios destes cupinzeiros brilhantes por naturalistas alemães desde o século XIX e sua identificação e descrição preliminar relatadas pelo doutorando Kent Redford da Harvard University, na época pesquisando os tamanduás do PNE.⁶⁵ Os

cupinzeiros luminosos, as cavernas com pinturas rupestres, as águas cantantes, o belíssimo e profundo *canyon* da nascente do Taquari, sobrevoado por araras, tucanos e majestosos urubus-reis, e nosso projeto de criação de um santuário ecológico de cupinzeiros luminosos dentro da Fazenda Santo Antônio (GO), com um laboratório avançado de pesquisas multidisciplinares e pousada para cientistas e turistas (projeto de um mestrando da FAU-USP), não foram suficientes para convencer o proprietário da fazenda e algumas autoridades municipais, estaduais (MS) e federais (Câmara dos Deputados) da importância e impacto de um roteiro turístico na região e proteção ambiental. Apenas logramos trazer à tona na mídia (jornais, MASP, Globo Ciência e Globo Rural) o até então esquecido PNE, ameaçado por caçadores clandestinos, agrotóxicos e queimadas. Fundamos a Associação em

Defesa do PNE, que foi posteriormente anexada a outra ONG similar da cidade de Mineiros (GO). Sabemos hoje que várias espécies de coleópteros, principalmente de fengodídeos, foram extintas nas redondezas, entre outros fatores, que queima das árvores do cerrado para produção de carvão.

Tratando-se de um fenômeno noturno, não nos surpreendeu que os próprios habitantes das cidades vizinhas desconhecêssem os cupinzeiros luminosos.

De outubro a dezembro, na estação das chuvas, quente, tão logo o sol se põe, milhares de cupinzeiros, com até cerca de até dois metros de altura, ficam polvilhados de cerca de algumas centenas de pequenas luzes verdes, como um majestoso campo repleto de árvores de Natal iluminadas (Figura 16).^{63,66}

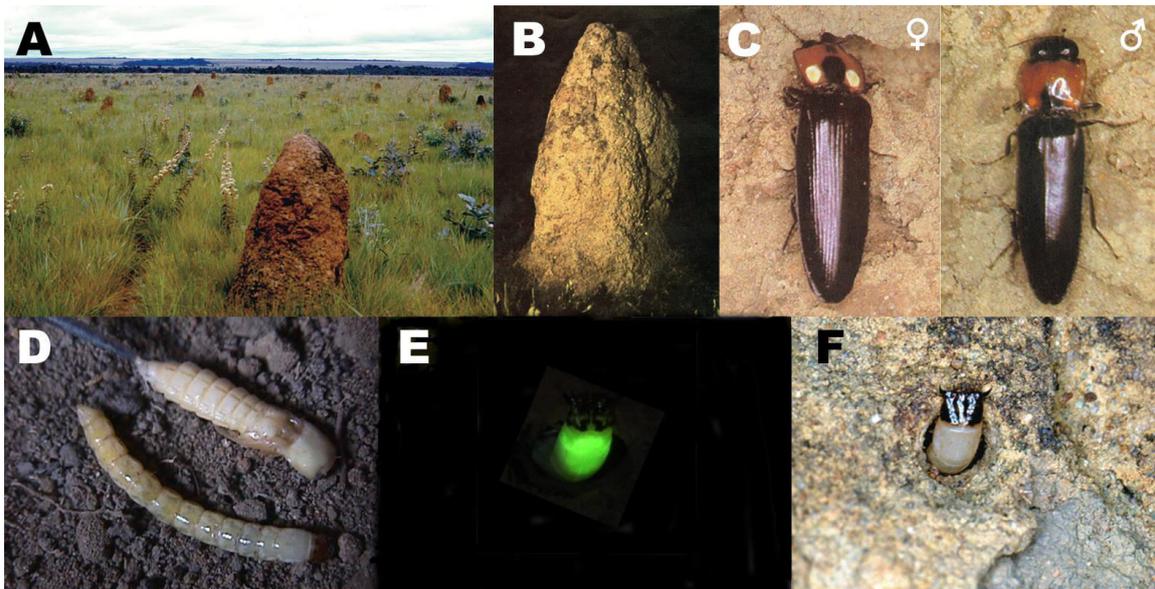


Figura 16. Os cupinzeiros luminosos do cerrado no Brasil central (MS, GO) (A-B). Insetos adultos, macho e fêmea (C),⁶⁶ larva e pupa (D) do elaterídeo *Pyrearinus termitiluminans*. Larva expõe sua cabeça e tórax brilhante em janelas de sua malha de túneis internos para atrair presas voadoras (cupins, formigas) e capturá-las (E-F). Fotos: Sérgio Vanin (IBUSP) exceto foto D, cortesia de C. Stevani (IQUSP)

Os cupinzeiros, quando menores, são aproximadamente cônicos, se suas bases não são danificadas por tamanduás à caça de formigas e cupins. À medida que são mais

altos ficam disformes pela predação e invasão de ninhos de outras espécies de cupim em sua superfície. Foram identificadas espécies de vários gêneros de cupins –

principalmente *Cornitermes*, *Paracornitermes*, *Embiratermes* e *Spinitermes* (ordem Isoptera) – que hospedam as larvas luminescentes do elaterídeo em seus ninhos. Nem todos os cupinzeiros emitem luz, segredo ainda guardado pela Natureza... apenas aqueles de coloração castanho-avermelhada, em comparação com outros mais esbranquiçados (presença de alumínio tóxico?). À primeira vista, pode parecer estranho que os soldados dos cupins, agressivos e protetores da megaprole da cupim-rainha, tolerem a presença de invasores, mas aventamos uma explicação para este fato a ser discutida posteriormente.

Além dos cupins, construtores e em princípio proprietários do “imóvel”, nele também residem formigas, larvas de dípteros, besouros, aranhas, escorpiões, lacraias, centopeias e opiliões, tornando mais excitante e arriscada a coleta manual das larvas e pupas do *Pyrearinus* com o auxílio de uma picareta para remover pedaços maiores onde se escondem as larvas.

Após as chuvas vespertinas, sem vento frio e à medida que o sol se põe, pequenas luzes verdes começam a pipocar na superfície dos cupinzeiros. São emitidas pelo protórax brilhante das larvas exposto em orifícios circulares da superfície, como janelas, sustentadas pelo abdômen encaixado na saída de túneis por elas escavados e com mandíbulas voltadas para cima. As centenas de luzes atraem nuvens de insetos, principalmente cupins e formigas alados, que são capturados pelas mandíbulas da larva e, em seguida, transportados para o interior do cupinzeiro. As larvas retornam às suas janelas, brilham ainda mais intensamente, capturam outra presa, o que se repete pelo menos 10-12 vezes até conseguir boa provisão para seu jantar. Ao morder a presa, a larva regurgita seu conteúdo digestivo, um líquido escuro de pH 7,3, que foi coletado em laboratório e analisado para a sua

composição enzimática.⁶⁷ Foram encontradas várias enzimas digestivas, entre elas, amilase, celulase, β -glicosidase e tripsina neste líquido, enquanto que aminopeptidase, α -glicosidase e trealase foram detectadas no intestino médio, todas elas com pHs ótimos na faixa de 6 a 8,5, portanto providencialmente próximos ao pH do conteúdo injetado nas presas. Tal como as aranhas, as larvas acumulam presas em digestão extracorpórea para, em seguida, voltarem ao alimento para sugar uma sopa de peptídeos, gordura e pequenos açúcares e completar a digestão no intestino médio. Outra observação interessante é que algumas das enzimas digestivas do *Pyrearinus termitilluminans* têm peso molecular múltiplo das mesmas enzimas de outras espécies de elaterídeos que habitam túneis de troncos apodrecidos. São, portanto, oligoméricas, o que sugere uma conquista evolutiva deste *Pyrearinus* ao capacitar-se a residir num ambiente com maior oferta de alimento.

A nuvem de insetos em torno dos cupinzeiros chama a atenção dos demais inquilinos do cupinzeiro – aranhas, lacraias, escorpiões – que saem de suas tocas para caçar e eventualmente se reproduzir, os quais por sua vez atraem outros predadores como sapos e aves noturnas (nota: quase todo cupinzeiro tem no topo um ninho de coruja).⁶³ O espetáculo visual da superfície dos cupinzeiros nos lembra um banquete à velas da Roma antiga, com muitos comensais divertindo-se. A fauna da superfície dos cupinzeiros também atrai pássaros diurnos. O excremento das aves é rico em sementes que, no solo, após germinação, nucleiam a vegetação arbustiva de cerrado em torno do cupinzeiro.⁶⁸ A rica biodiversidade de animais que residem ou visitam o cupinzeiro foi fielmente retratada numa aquarela da artista plástica Isabel de Jesus, Franco da Rocha, SP (Figura 17).



Figura 17. Aquarela da pintora *naif* Isabel de Jesus retratando, em sua imaginação, a diversa fauna dos cupinzeiros luminosos do cerrado (Coleção de Arte Naif de Etelvino Bechara, SP). Os pontos amarelos sobre a superfície do cupinzeiro representam as lanternas as larvas do pirilampo *Pyrearinus termitilluminans*

As raízes das plantas convidam roedores, que por sua atraem cobras; quase todo cupinzeiro tem um ninho de cobra na sua base, provavelmente escavado por tatus e tamanduás. Esta longa e exuberante cadeia/rede alimentar ainda espera biólogos que a possam descrever sistematicamente com maior precisão. Alguns espécimes de fengodídeos também foram encontrados nas proximidades dos cupinzeiros.

Elaterídeos adultos de *Pyrearinus termitilluminans* sobrevoam as proximidades dos cupinzeiros para reprodução. As fêmeas fertilizadas botam ovos, não na superfície dos cupinzeiros como relatado por Redford,⁶⁵ mas no solo que circunscreve a base do cupinzeiro. Isto é evidenciado pelo fato de, nos meses de março-maio, poder-se observar um halo luminoso ao redor da base do cupinzeiro produzido por miríades de minúsculas larvas luminescentes de *Pyrearinus* em estágios iniciais de crescimento, alimentadas pela microfauna do

solo.⁶⁴ À medida que se desenvolvem, as larvas iniciam a escavação de pequenos túneis na base do cupinzeiro em direção às partes superiores, como se estivessem subindo na camada superficial da estrutura do cupinzeiro. Daí notar-se, grosseiramente, um gradiente de larvas menores na base e larvas maiores no topo do cupinzeiro.

Com o intuito de esclarecer como cupins e larvas do *Pyrearinus* convivem pacificamente dentro do cupinzeiro, moldamos com poliestireno os domínios dos cupins e larvas de *Pyrearinus*.⁶³ Para tanto, injetamos à noite, com o êmbolo da seringa sob forte pressão, uma mistura de estireno e peróxido nas janelas iluminadas de sua superfície visando elucidar a estrutura dos domínios de uma e outra espécie pelo poliestireno solidificado no interior do cupinzeiro. Serrada uma porção do cupinzeiro, a mais rica em larvas, e dissolvida a massa de argila do cupinzeiro com soda quente, os moldes dos túneis e galerias revelaram o segredo desta

convivência pacífica entre cupins e pililampos (Figura 18): as larvas constroem um rede intrincada de túneis a cerca de 1-3 cm de profundidade - um complexo labirinto desuniforme -, com diâmetro variado (0,1 a 0,3 cm), interconexões e saídas para fora do cupinzeiro, onde as larvas expõem suas lanternas para caçar (Figura 18AB).

Constatou-se também que a janela surge de um túnel que se aprofunda 10-15 cm, faz uma curva em U (Figura 18A) e se bifurca na rede do labirinto (Figura 18C). Cerca de 1 a 2 cm da saída, abre-se um largo átrio onde são acumuladas as presas capturadas no exterior e já preparadas para digestão completa, como se fosse uma sala de jantar.

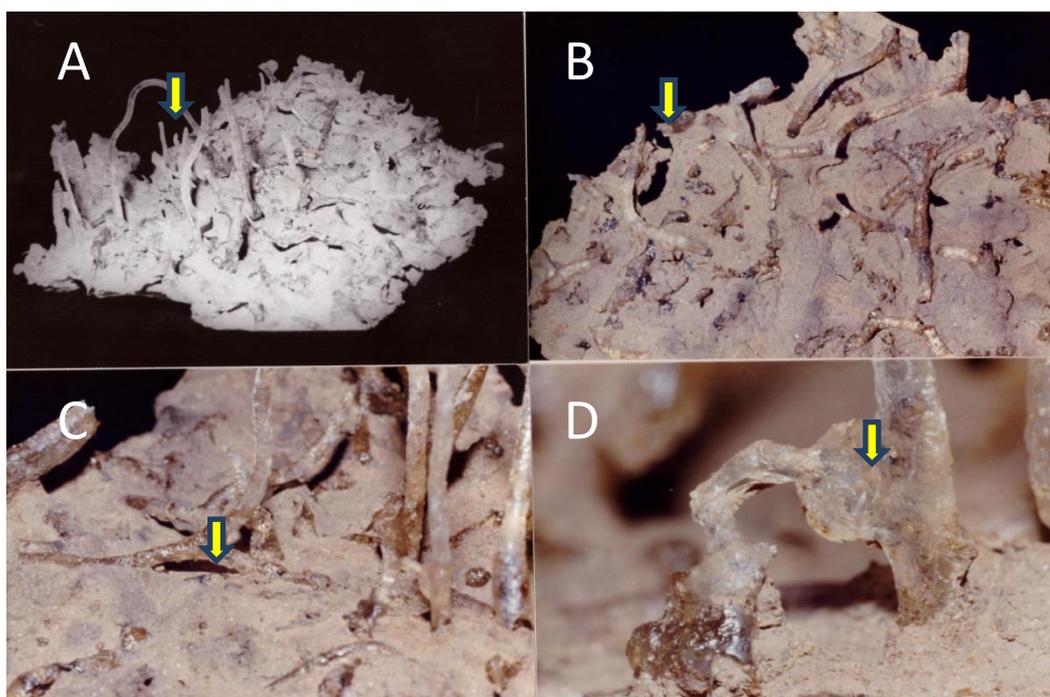


Figura 18. Moldes em poliestireno da rede de túneis e câmara de alimentação das larvas de *Pyrearinus termitilluminans* escavados dentro dos cupinzeiros luminosos.⁶³ A. Vista geral da rede intrincada de túneis, com seta apontando a curva em U do túnel que desemboca no exterior ("janela" da larva). B. Vista detalhada da rede de túneis. C. Junção de dois túneis da rede para formar a curva em U. D. Atrium (câmara de alimentação) onde a larva estoca suas presas capturadas nas janelas sob digestão extra-corpórea. Este atrium em particular mostra uma conexão com uma câmara de cupins, de onde pode predar suas operárias

O labirinto de túneis permite que as larvas migrem rapidamente para janelas do lado oposto do cupinzeiro não bafejados por vento, que dispersa as presas voadoras. Das dezenas de moldes obtidos, apenas um mostrou uma conexão que liga o átrio a uma galeria ampla de cupim (Figura 18D), sugerindo que eventualmente a larva pode se alimentar de operárias que distraidamente caem na "sala de jantar". O caminho inverso é pouco provável, pois a larva seria morta pelos cupins-soldados. Especula-se também que, face ao fato das larvas serem carnívoras

(em laboratório, onívoras) e agressivas, a lanterna no abdômen terminal poderia funcionar como uma lanterna traseira de alerta para outra larva atrás dela à busca de uma janela para caçar.

Durante o inverno, não há revoada de isópteros (cupins e formigas) e os cupinzeiros permanecem apagados entre abril e agosto. Como as larvas se alimentam e obtêm água? Esta é outra pergunta que merece investigação sistemática. Se, de fato, há conexões entre os túneis das larvas e as

câmaras dos cupins, onde transitam operárias, então poder-se-ia aventar que o alimento é disponível. Mas qual seria o sentido de predar na superfície do cupinzeiro apenas durante as chuvas se há farto sustento no interior do ninho dos cupins? Uma possibilidade que merece atenção é verificar se, nestas condições extremas, as larvas entram em hibernação e sobrevivem às custas das reservas energéticas acumuladas durante as chuvas e de água metabólica obtida da degradação de trealose, um dissacarídeo formado entre duas unidades de glicose (ligação α,α -1,1, açúcar não redutor). Nossos estudos preliminares, ao analisar os conteúdos de glicose e trealose em larvas do *Pyrearinus* criadas em estufa climatizada nas condições de temperatura e umidade, mostraram que esta é uma hipótese plausível.⁶⁹ Além de combustível de reserva para a larva, a trealose é conhecida como um estabilizador da supra-estrutura de membranas biológicas e da conformação ativa, funcional, de proteínas, daí seu uso na conservação de células em cultura e órgãos destinados a transplantes. Estas propriedades também explicariam o fato de ovos e larvas de *Pyrearinus*, em laboratório, sobreviverem acidentalmente por várias semanas sem que fossem umedecidos ou alimentados, mas recuperando sua vitalidade quando fornecida água.

Esta convivência de cupins com larvas do *Pyrearinus termitilluminans* tipifica claramente uma relação de inquilinismo, não de simbiose, uma vez que o elaterídeo se beneficia da presença de cupins, seu alimento, mas não esclarece quais vantagens teriam os cupins de hospedá-los.

10. Coleta, criação e descrição de espécies de insetos luminescentes

Nos cerrados em torno do PNE encontramos as maiores concentrações e diversidade de coleópteros luminescentes, em relação à Mata Atlântica, como na

Represa Guarapiranga, Serra da Cantareira, Atibaia e Boracéia. Foi na Fazenda Olho D'Água, vizinha à cerca do PNE, que D. Clarinda (Figura 19), uma parteira e tecelã idosa, falou dos insetos que emitiam luz vermelha à noite. Surpresos, pois seria a primeira indicação da ocorrência de fengodídeos na região, montamos uma armadilha de pano e logramos coletar machos de várias espécies desta família. Em outra fazenda, a Santa Cruz, de propriedade de outra matrona idosa, D. Luzia, com a ajuda de seus filhos e netos, obtivemos uma grande coleção de vários gêneros e espécies de elaterídeos e fengodídeos. Interessante notar que as duas importantes protagonistas da nossa pesquisa de campo sobre insetos luminosos chamavam-se D. Clarinda e D. Luzia, nomes alusivos à luz. Os elaterídeos foram identificados pela Dra. Cleide Costa (MZUSP) e os fengodídeos pelo Dr. Walter Wittmer (Museum of Natural History, Basileia, Suíça). Três novas espécies de fengodídeos foram nomeados *Phrixothrix viviani*, em homenagem ao Dr. Vadim Viviani, um dos autores deste relato, *Euryopa clarindae*, um tributo à D. Clarinda, e *Euryopa laurae* para comemorar o nascimento de Laura, filha do outro autor. A interação cientista-sociedade é obviamente sempre bem-vinda, se não necessária, não só para educar como também incorporar a sabedoria popular, os conhecimentos tradicionais, à construção da ciência.

Larvas e adultos de elaterídeos e fengodídeos foram criados em laboratório, inicialmente no MZUSP com a permissão e interesse de seu diretor, Prof. Paulo Vanzolini, e posteriormente no IQUSP, cujo motorista José Sanches também teve papel destacado na coleta dos insetos, rapidamente incorporou conhecimentos e práticas de coleta e identificação e quase se torna um candidato a entomólogo amador. As larvas de elaterídeos eram alimentadas com operárias de cupins e as larvas e fêmeas de fengodídeos com “piolho-de-cobra”, um diplopoda. É interessante notar que, em laboratório, as larvas de *P. termitilluminans* tinham “memória” do campo. Nos frascos

transparentes com terra onde eram criadas, cavavam túneis e ao entardecer expunham

seu tórax brilhante nas janelas dos túneis à busca de presas aladas.



Figura 19. Moradores e turistas no município de Costa Rica (MS), onde insetos de lampirídeos, elaterídeos e fengodídeos foram coletados, com destaque para os dois idosos: D. Clarinda, parteira e tecelã, e seu marido, Sr. Otaviano, caçador de onças tragicamente fulminado por um raio

Fengodídeos adultos, tão logo traçados os espectros de bioluminescência, eram sacrificados e preparados extratos de suas lanternas cefálicas e abdominais, pois morriam poucos dias após a coleta. Larvas e fêmeas de fengodídeos foram criadas em laboratório até que algumas delas depositavam ovos (Figura 20).¹⁰ Obviamente, a variedade das cores da bioluminescência dos fengodídeos, do verde ao vermelho, são um prato cheio para biólogos moleculares estudarem as relações estrutura-função já que a reação enzimática é a mesma e as diferentes cores abrem caminho para clonagem de genes repórteres multifuncionais. O sucesso na criação de fêmeas fertilizadas de *Phrixothrix heydenii* resultou na obtenção de machos e fêmeas desta espécie de fengodídeo e, pela primeira vez, estes insetos, já documentados em 1535 por Oviedo em sua *Historia General y Natural*

de las Indias, tiveram descritos seu ciclo biológico completo.¹

Esta foi uma grande conquista pois o pareamento imediato de fengodídeos é dificultado pelo enorme dimorfismo sexual dos insetos adultos: o macho é pequeno (milímetros a 1-1,5 cm) e alado, enquanto a fêmea é larviforme, áptera, e maior (0.5-3 cm) (Figura 1).

Elaterídeos adultos são mais resistentes em laboratório, deles podendo-se coletar ovos nos frascos onde eram criados com água açucarada. Machos vivem até cerca de dois meses e fêmeas, três meses, e na fase larval, cerca de dezoito meses. Observamos que ao longo de toda sua metamorfose, o elaterídeo *Pyrophorus divergens* emite luz.¹⁵ Especula-se que nas fases de ovos e pupas, dada à sua imobilidade e suscetibilidade à predação, talvez a luz emitida sirva para distrair a atenção ou afugentar um possível predador.

Larvas de *Pyrearinus termitilluminans* eram criadas às centenas em laboratório para estudos bioquímicos e os elaterídeos adultos de outras espécies, após traçados sua bioluminescência (e, poucas vezes, o eletroretinograma), eram desidratados em dessecador a vácuo com P_2O_5 e estocados em freezer para testes bioquímicos. Ao longo da desidratação, notava-se que as lanternas do elaterídeo *Pyrophorus* ficavam acesas e sua

cor gradualmente deslocava-se do verde para o vermelho intenso. Se este fato deve-se à inativação de isozimas do protórax de luciferases que eliciam cores mais avermelhadas, descritas por DeLuca e Wood em *Pyrophorus plagiophthalmus*, ou à mudança do metabolismo para anaeróbico e consequentes alterações de pH e da estrutura terciária da enzima, é uma questão em aberto.

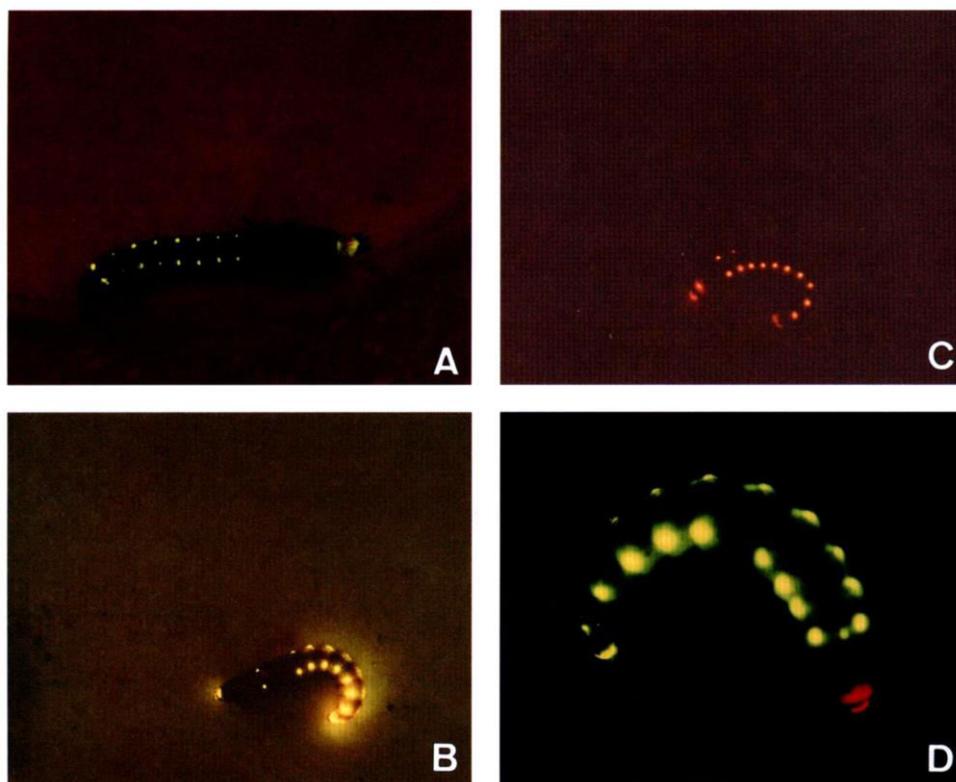


Figura 20. Larvas e fêmea de quatro espécies de fengodídeos com lanternas de diferentes cores: A, *Brasilocerus impressicolor*, larva; B, *Mastinomorphus* sp₂, larva; C, *Mastinomorphus* sp₁, fêmea; D, *Phrixothrix heydeni*, larva.¹⁰ Copyright 1997 Entomological Society of America

11. Aplicações tecnológicas da bioluminescência

A luciferase e a luciferina de vagalumes são utilizadas há cerca de 50 anos como reagentes bioanalíticos.¹² Como a reação depende da presença de ATP, além de oxigênio molecular, luciferina e luciferase têm sido empregados para detectar e

quantificar ATP via bioluminescência. Considerando que esta é a molécula estocadora de energia nas células vivas, pode ser mensurada e usada como marcadora em uma pletera de amostras biológicas, inclusive biomassa e contaminação microbiológica de alimentos, água tratada, bebidas e medicamentos, entre outros. Após a clonagem do cDNA (gene *luc*) que codifica a luciferase de vagalumes, várias outras aplicações que empregam este gene, e a

luciferase produzida, foram desenvolvidas. Entre estas, destaca-se o uso do gene da luciferase em kits diagnósticos de pneumonia, AIDS e metástase de tumores, e para auxiliar a indústria farmacêutica a prospectar e desenvolver novas drogas terapêuticas como antibióticos e antitumorais.²¹ Outra área de aplicações analíticas emprega os genes de luciferases de besouros em biossensores enzimáticos e celulares destinados a detectar a presença de poluentes e agentes tóxicos tais como metais pesados em águas, por exemplo no kit

NanoLuc®Luciferase da Promega. Notavelmente, algumas destas aplicações envolvem o uso de luciferases que emitem diferentes cores de bioluminescência oriundas de vagalumes brasileiros, como a larva do trenzinho, clonadas e desenvolvidas por Viviani e colaboradores na USP, Universidade de Shizuoka (Japão), UNESP e UFSCAR.^{70,71} A Figura 21 reúne algumas aplicações analíticas do sistema luciferina/luciferase de vagalumes.

Análises clínicas - dosagem de metabólitos e enzimas que possam ser acoplados ao gasto ou produção de ATP.

Análises microbiológicas - monitoração de contaminação microbiana de alimentos, medicamentos, água tratada e amostras hospitalares.

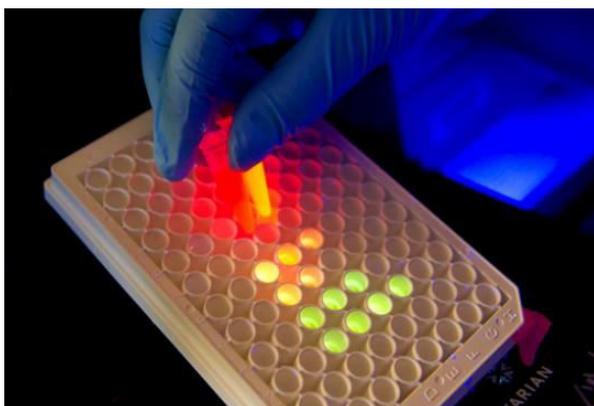
Biotecnologia - uso do gene da luciferase (*luc*) como “gene repórter” em bactérias transformadas para produção de proteínas, enzimas e hormônios.

Outros - monitoração de fito- e zooplâncton, pesquisa espacial, “lanternas químicas”, detecção de vírus, fungos e bactérias, etc.

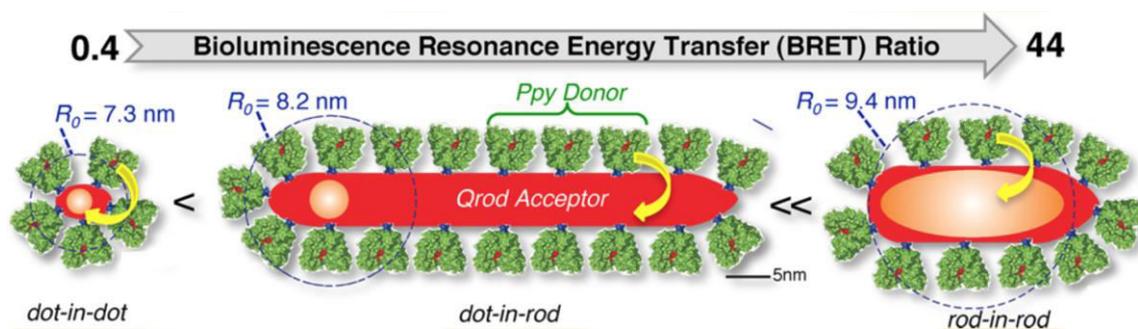
Figura 21. Aplicações tecnológicas do sistema luciferina/luciferase de vagalumes para dosagem de ATP em amostras biológicas e ambientais

Mais recentemente foi relatado o desenvolvimento de nanobastões quânticos semicondutores como aceptores da luz emitida por uma luciferase mutante do lampirídeo *Photinus pyralis*, obtida por técnicas de biologia molecular, e acoplada covalentemente ao bastão, para intensificar o sinal luminoso quando se adiciona luciferina (Figura 22).⁷² Estes sistemas de transferência de energia a longa distância (transferência Förster), denominados BRETS

(*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) foram desenvolvidos com outras luciferases, por exemplo, do cnidário *Renilla reniformes* (*sea pansy*, “rim-do-mar”). Variando-se o comprimento do nanobastão, luzes de diferentes cores são eliciadas, permitindo que luz azul-esverdeada possa ser convertida em vermelho ou mesmo infravermelho, as quais são particularmente úteis para imageamento *in vivo*.



Bioluminescência artificial de vagalumes 20 a 30 vezes mais eficiente que a natural, em uma estrutura de nanobastões quânticos, contendo CdS (camada externa) e CdSe (núcleo), aos quais a luciferase está ligada.



Alterando o tamanho do núcleo e o comprimento do nanobastão ("rod"), é possível mudar a cor da luz gerada pelo nanobastão.

Figura 22. Bastões quânticos para otimização de transferência Foster da energia de luz emitida por luciferina/luciferase de *Photius pyralis* (Lampyridade) e núcleo/capa semicondutora de CdSe/CdS (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*, BRET). Adaptado da ref. 72. Copyright 2012 American Chemical Society

12. E o futuro da pesquisa da bioluminescência de insetos no Brasil?

Verifica-se crescente interesse e progresso na investigação da biologia e bases moleculares da bioluminescência de organismos terrestres e marinhos, enquanto ciência fundamental e aplicada, no desenvolvimento de sondas, sensores, marcadores e mesmo fontes alternativas de luz. A era dos radio-imunoensaios, com as descobertas dos mecanismos de bioluminescência e quimioluminescência de vários sistemas químicos e enzimáticos, cedeu lugar aos lumi-imunoensaios, mais baratos e seguros. Não resta dúvida de que a

diversidade química das luciferinas e a identificação do microambiente peptídico do sítio ativo das luciferases pavimentam o caminho para o desenho e síntese de sistemas miméticos mais simples para otimização dos sinais luminosos (cor e intensidade) e operação em ambientes químicos e biológicos dos mais diversos.

Os 25 anos de pesquisas dos besouros luminescentes no cerrado brasileiro, nos deixou perplexos e de certa forma frustrados com tantas perguntas não respondidas. A bela escultura do *Museum of Fine Arts* (Boston) - *Nature Unveiling Herelf before Science*-, já citada no início deste artigo, está metaforicamente destinada a continuar o seu desnudamento para o deleite dos cientistas e a felicidade da humanidade. Quantas novas espécies de coleópteros bioluminescentes

nos aguardam na Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampas, Pantanal e mesmo no Cerrado? Existem insetos ou anelídeos bioluminescentes nas cavernas brasileiras, tal como documentado na Australásia e Estados Unidos? Quais os papéis das diferentes cores das lanternas e padrões de atração e corte sexual em fengodídeos? Há processos de extinção destes insetos em curso relacionados a defensivos agrícolas ou iluminação artificial que tornam “invisíveis” os parceiros sexuais? Larvas e fêmeas de fengodídeos imobilizam suas enormes presas (diplopodas) por neuroinibidores presentes no líquido paralisante nelas injetado? O açúcar trealose desempenha algum papel protetor (antioxidante, estabilidade de membranas e proteínas, fonte de água metabólica) nas larvas de *Pyrearinus termitilluminans* durante o período de estresse hídrico (inverno)? Por que apenas cupinzeiros marrom-avermelhados, e não os cinzentos, hospedam o *P. termitilluminans*; alguma relação com a composição química do solo, presença de alumínio tóxico, acidez? E a convivência entre larvas canibais de *P. termitilluminans* e os cupins-soldados agressivos dentro dos cupinzeiros; alguma relação simbiótica entre estes insetos? Qual o papel dos cupinzeiros luminosos na nucleação de vegetação em torno do cupinzeiro e que espécies vegetais são mais disseminadas no cerrado? Quantos analitos ou tecidos animais e vegetais poderiam ser monitorados pelo sistema bioluminescente destes insetos? Alguma possibilidade de amplificar a intensidade da luz emitida por nanotubos quânticos à base de luciferases, dopados com íons de terras raras? E as crianças e população em geral, especialmente do interior do Brasil, o quanto conhecem, protegem e valorizam a luz biológica? Tribos tradicionais do Caribe fazem seu uso há séculos, magnificamente retratado por Rugendas! Há longo caminho ainda a percorrer.

No caso específico dos besouros luminescentes, afortunadamente muitos pesquisadores brasileiros deram contribuições importantes ao conhecimento da biologia, bioquímica e ecologia destes

insetos e à bioluminescência em geral. Entre eles, incluem-se os biólogos Cleide Costa (Museu de Zoologia, USP) e Sérgio Vanin (Instituto de Biociências, USP), o bioquímico Vadim Viviani (UFSCar, campus Sorocaba) - um dos autores deste artigo-, os químicos Cassius Stevani e Pio Colepícolo Neto (Instituto de Química, USP), Marcelo Barros (UNICSUL, São Paulo), Moacir Torres (UDESC, Lajes) e, muito recentemente, iniciando estudos de anelídeos aquáticos luminescentes, o químico Anderson Garbuglio de Oliveira (Instituto Oceanográfico, USP). Aguardamos ansiosamente jovens talentosos, inspirados e decididos a aumentarem a população de pesquisadores “brilhantes” em nosso país.

Dedicatória

Este artigo de divulgação é dedicado aos pesquisadores do Biological Laboratories da Harvard University, Prof. John Woodland (“Woody”) Hastings e Dra. Thérèse Wilson, recém-falecidos. Ambos contribuíram significativamente para a implantação das linhas de quimioluminescência e bioluminescência no Brasil ao supervisionarem e acompanharem vários pesquisadores brasileiros, com generosas doações de equipamentos e reagentes e contínuo incentivo e discussões científicas. Entre eles, os dois autores deste artigo e Pio Colepícolo, Luiz Henrique Catalani, Guilherme Indig e Osvaldo Keith Okamoto, além de colaborarem com os Drs. Paolo Di Mascio, Marisa Helena Genari de Medeiros e Cassius Stevani. O Prof. Woody Hastings distinguiu-se pelas pesquisas em bioluminescência marinha, particularmente sobre as bactérias bioluminescentes simbiotes de peixes e o dinoflagelado bioluminescente *Goniaulax polyedra*, além de elucidar a biologia molecular dos ritmos circadianos da alga *Goniaulax*. A Dra. Thérèse Wilson deu contribuições seminais à síntese e propriedades quimioluminescentes de dioxetanos e ao estudo das propriedades de oxigênio singlete.

Agradecimentos

Várias Fundações e Agências contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento de nossas pesquisas sobre bioluminescência de coleópteros: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), John Simon Guggenheim Memorial Foundation, Volkswagen Foundation, Banco Interamericano de Desenvolvimento. Agradecemos ao Prof. Cassius Stevani (USP) por disponibilizar foto inédita de cogumelos luminescentes, elaborar esquemas e organizar fotos, fazer a revisão deste artigo, colaborar nas coletas, e contínuo apoio e incentivo. Agradecimentos especiais aos nossos professores de Entomologia e diletos amigos, Cleide Costa (MZUSP) e Sérgio Vanin (IBUSP), parceiros no desenvolvimento da pesquisa da bioluminescência de coleópteros, e aos alunos de pós-graduação de EJHB que desenvolveram com afinco, curiosidade, independência, brilhantismo e coragem as pesquisas iniciais destes insetos: Pio Colepicolo Neto, Vadim Viviani (co-autor deste artigo), Marcelo Barros e Moacir Torres. Também agradecemos vários pesquisadores brasileiros e estrangeiros que colaboraram nas pesquisas da bioluminescência do cerrado brasileiro, entre eles: Walter Terra, Clélia Ferreira, Roberto Santelli, Fernando Reinach (Instituto de Química USP), Dora Ventura (Instituto de Psicologia USP), Walter Wittman (Museum of Natural History, Suíça), Abner Lall (Howard University, USA), Graham Timmins (University of New México, USA), Harold Swartz (Dartmouth Medical School, USA) e Yoshihiro Ohmiya (Shizuoka University, Japão).

Referências Bibliográficas

- ¹ Harvey, E. N.; *A History of Luminescence – From the Earliest Times Until 1900*, The American Philosophical Society: Philadelphia, 1957.
- ² Moraes, R. B. Notícia do Brasil. *Biblioteca Histórica Brasileira*, vol 16, pt.2. Editora Livraria Martins: São Paulo, 1940.
- ³ Lloyd, J. E.; *Insect Bioluminescence*. Em *Bioluminescence in Action*; Herring, P. J., ed.; Academic Press: London, 1978, cap. 8.
- ⁴ Bechara, E. J. H. Vagalumes: da química à biotecnologia. *Química Nova* **1994**, *17*, 224. [\[Link\]](#)
- ⁵ Bechara, E. J. H.; Colepicolo-Neto, P.; Viviani, V.; Barros, M. P.; Costa, C. Colors and biological functions of beetle bioluminescence. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **1999**, *71*, 169.
- ⁶ Viviani, V. R. Luciferasas: As enzimas da luz. *Ciencia Hoje* **2004**, outubro, 18. [\[Link\]](#)
- ⁷ Haddock, S. H. D.; Moline, M. A.; Case, J. F. Bioluminescence in the sea, *Annual Review of Marine Science* **2010**, *2*, 443. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁸ Costa, C. 1999. Coleoptera. Em *Invertebrados Terrestres*. vol. V, *Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX*; Brandão, C. R. F.; Cancellato, E. M. eds. (Joly, C. A.; Bicudo, C. E. M. orgs); FAPESP: São Paulo, 1999, xviii.
- ⁹ Wittmer, W. Arbeiten zu eniner revision der familie Phengodidae. *Entomologische Arbeiten aus dem Museum G Frey Tutzing Bei Muenchen* **1976**, *27*, 415.
- ¹⁰ Viviani, V. R.; Bechara, E. J. H. Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroad-worms (Coleoptera:Phengodidae). *Annals of the Entomological Society of America* **1997**, *90*, 389.
- ¹¹ Wilson, T.; Hastings, J. W.; *Bioluminescence – Living Lights, Lights for Living*, Harvard University Press: Cambridge (U. S. A.), 2013.
- ¹² Meyer-Rochow, V. B. Glow worms: a review of *Arachnocampa* spp. and kin.

- Luminescence* **2007**, *22*, 251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Petushkov, V. N.; Dubinnyi, M. A.; Tsarkova, A. S.; Rodionova, N. S.; Baranov, M. S.; Kublitski, V. S.; Shimomura, O.; Yamposky, I. V. A novel type of luciferin from the Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 5566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ McElroy, W. D.; DeLuca, M. Chemistry of Firefly Luminescence. Em *Bioluminescence in Action*; Herring, P. J., ed.; Academic Press: London, 1978, cap. 4.
- ¹⁵ Colepicolo Neto, P.; Costa, C.; Bechara, E. J. H. Brazilian species of luminescent Elateridae. Luciferin identification and bioluminescence spectra. *Insect Biochemistry* **1986**, *16*, 803. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Viviani, V. R.; Bechara, E. J. H. Bioluminescence of Brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae): Spectral distribution and pH effect on luciferase-elicited colors. Comparison with elaterid and phengodid luciferases. *Photochemistry and Photobiology* **1995**, *62*, 490. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Viviani, V. R.; Bechara, E. J. H.; Ohmyia, Y. Cloning, sequence analysis and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* **1999**, *38*, 8271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Stevani, C. V.; Bechara, E. J. H. Águas-vivas Luminosas. *Ciência Hoje* **2008**, *43*, 21.
- ¹⁹ Campbell, A. K. *Chemiluminescence – Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Horwood: Cambridge, 1988.
- ²⁰ Chalfie, M.; Kain, SR *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols*. Wiley-Interscience: Hoboken, 2006. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Esimbekova, E.; Kratasyuk, V; Shimomura, O. Application of enzyme bioluminescence in ecology Em *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology*, vol. 1; Thouand, G.; Marks, R., eds; Springer: Heidelberg, 2014. [[CrossRef](#)]
- ²² Roda, A.; Guardigli, M.; Micheline, E.; Mirasoli, M. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. *Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 307. [[CrossRef](#)]
- ²³ Dubois, R. Les elatérides lumineux. *Bulletin Societé Zoologie de France* **1886**, vol. xi, 1.
- ²⁴ Hastings, J. W. Bacterial and dinoflagellate luminescent systems Em *Bioluminescence in Action*; Herring, P. J., ed.; Academic Press: London, 1978, cap. 5.
- ²⁵ Hastings, J. W.; Johnson, C. H. Bioluminescence and chemiluminescence. *Methods in Enzymology* **2003**, *360*, 75. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Desjardin, D. E.; Oliveira, A. G.; Stevani, C. V. Fungi bioluminescence revisited. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2008**, *7*, 170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Oliveira, A. G.; Garbuglio, A.; Carvalho, R. P.; Waldenmaier, H. E.; Stevani, C. V. Fungi bioluminescence: distribution, function and mechanism of light emission. *Química Nova* **2013**, *36*, 314. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Bitler, B.; McElroy, W. D. Preparation and properties of crystalline firefly luciferin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1957**, *72*, 358. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ White, E. H.; McCapra, F.; Field, G.; McElroy, W. D. The structure and synthesis of firefly luciferin. *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83*, 2402. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Colepicolo Neto, P.; Pagni, D.; Bechara, E. J. H. Luciferin biosynthesis in larval *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **1988**, *91B*, 143. [[CrossRef](#)]
- ³¹ Niwa, K. ; Ichino, Y. ; Kumata, S. ; Nakajima, Y. ; Hiraishi, Y. ; Kato, D. I. ; Viviani, V. R. ; Ohmiya, Y. . Quantum yields and kinetics of firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochemistry and Photobiology* **2010**, *20*, 1046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² White, E. H.; Steinmetz, M. G.;J. D.; Wildes, P. D.; Morland, R. Chemi-luminescence and bioluminescence of firefly luciferin. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 3199. [[CrossRef](#)]
- ³³ Wood, K. V. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology* **1995**, *62*, 662. . [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Adam, W; Liu, J. C. Alpha-peroxy lactones synthesis and chemiluminescence. *Journal of*

- the American Chemical Society **1972**, *94*, 2894. [CrossRef]
- ³⁵ Shimomura, O.; Johnson, F. H Elimination of the effect of contaminating CO₂ in the O-18-labeling of the CO₂ produced in bioluminescent reactions. *Photochemistry and Photobiology* **1979**, *30*, 89. [CrossRef]
- ³⁶ Bechara, E. J. H.; Wilson, T. Alkyl substituent effects on dioxetane properties. Tetraethyl-, dicyclohexylidene-, and 3,4-dimethyl-3,4-di-*n*-butyldioxetanes. A discussion of decomposition mechanism. *Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45*, 526. [CrossRef]
- ³⁷ Adam, W.; Baader, W. J. 1,2-Dioxetane - synthesis, characterization, stability, and chemi-luminescence. *Angewandte Chemie* **1984**, *23*, 166. [CrossRef]
- ³⁸ Cilento, G.; Adam, W. From free radicals to electronically excited states. *Free Radical in Biology and Medicine* **1995**, *19*, 103. [CrossRef]
- ³⁹ Kopecky, K. R.; Mumford, C. Luminescence in thermal decomposition of 3,3,4-trimethyl-1,2-dioxetane. *Canadian Journal of Chemistry* **1969**, *47*, 709. [CrossRef]
- ⁴⁰ Koo, J. Y.; Schmidt, S. P.; Schuster, GB Bioluminescence of firefly - key steps in formation of electronically excited-state for model systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S.* **1978**, *75*, 30. [Link]
- ⁴¹ Viviani, V. R.; Silva, A. C. R.; Perez, G. L. O.; Santelli, R. V.; Bechara, E. J. H.; Reinach, F. C. Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, *70*, 254. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴² Viviani, V. R.; Arnoldi, F. G. C.; Silva Neto, A. J.; Ohelmeyer, T. L.; Bechara, E. J. H.; Ohmiya, Y. The structural origin and biological functions of pH-sensitivity in beetle luciferases. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2008**, *8*, 159. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴³ Hirano, T.; Nagai, H.; Mastuhashi, T.; Hasumi, Y.; Iwano, S.; Ito, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Viviani, V. R. Spectroscopic Studies of the Color Modulation Mechanism of Firefly (Beetle) Bioluminescence with Amino-analogs of Luciferin and Oxyluciferin. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2012**, *11*, 1281. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁴ Viviani, V. R.; Bechara, E. J. H. Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze firefly D-luciferin and ATP dependent chemiluminescence: a luciferase-like enzyme. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *63*, 713. [CrossRef]
- ⁴⁵ Oba, Y.; Ojika, M.; Inouye, S. Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. *FEBS Letters* **2003**, *540*, 251. [CrossRef]
- ⁴⁶ Viviani, V. R.; Prado, R. A.; Neves, D. R.; Kato, D.; Barbosa, J. A. A route from darkness to light: Emergence and evolution of luciferase activity in AMP-CoA-ligases inferred from a mealworm luciferase-like enzyme. *Biochemistry* **2013**, *52*, 3963. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁷ Werner, M.; Gabrielson; D. G.; Eastman, J. Ultramicro determination of serum triglycerides by bioluminescent assay. *Clinical Chemistry* **1981**, *27*, 268. [PubMed]
- ⁴⁸ Lall, A. B.; Cronin, T. W.; Carvalho, A. A.; Souza, J. M.; Barros, M. P.; Stevani, C. V.; Bechara, E. J. H.; Ventura, D. F.; Viviani, V. R.; Hill, A. A. Vision in click beetles (Coleoptera: Elateridae): pigments and spectral correspondence between visual sensitivity and species bioluminescence emission. *Journal of Comparative Physiology A* **2010**, *196*, 629. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁹ Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; and G Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1987**, *84*, 9265. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁰ Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **1987**, *327*, 524. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵¹ Aprille, J. R.; Lagace, C. J.; Modica-Napolitano, J.; Trimmer, B. A. Role of nitric oxide and mitochondria in control of firefly

flash. *Integrative and Comparative Biology* **2004**, *44*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁵² Bechara, E. J. H.; Costa, C.; Colepicolo, P.; Viviani, V.; Barros, M. P.; Timmins, G. S.; Lall A. B.; Terra, W. R.; Ferreira, C.; Stevani, C. V.; Torres, M. A. Chemical, biological and evolutionary aspects of beetle bioluminescence. *ARKIVOC* **2007**, *VIII*, 311. [[CrossRef](#)]

⁵³ Boolell, M.; Allen, M. J.; Ballard, S. A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G. J.; Naylor, A. M.; Osterloh, I. H.; Gingell, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction". *International Journal of Impotence Research* **1996**, *8*, 47. [[PubMed](#)]

⁵⁴ Timmins, G. S.; Bechara, E. J. H.; Swartz, H. M. Direct determination of the kinetics of oxygen diffusion to the photocytes of a bioluminescent elaterid larva, measurement of gas- and aqueous-phase diffusional barriers and modelling of oxygen supply. *Journal of Experimental Biology* **2000**, *203*, 2479. [[PubMed](#)]

⁵⁵ McCord, J. M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. *Journal of Biological Chemistry* **1969**, *244*, 6049. [[PubMed](#)]

⁵⁶ Sies, H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 8735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁵⁷ Azzi, A.; Davies, K. J. A.; Kelly, F. Free radical biology – terminology and critical thinking. *FEBS Letters* **2004**, *558*, 3. [[CrossRef](#)]

⁵⁸ Rees, J. F.; de Wergifosse, B.; Noiset, O.; Dubuisson, M.; Janssens, B.; Thompson, E. M. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. *Journal of Experimental Biology* **1998**, *201*, 1211. [[PubMed](#)]

⁵⁹ Timmins, G. S.; Jackson, S. K.; Swartz, H. M. The evolution of bioluminescent oxygen consumption as an ancient oxygen detoxification mechanism. *Journal of Molecular Evolution* **2001**, *52*, 321. [[PubMed](#)]

⁶⁰ Colepicolo Neto, P.; Bechara, E. J. H.; Costa, C. Oxygen toxicity aspects in luminescent and non-luminescent elaterid larvae. *Insect Biochemistry* **1986**, *16*, 381. [[CrossRef](#)]

⁶¹ Barros, M. P.; Bechara, E. J. H. Bioluminescence as a possible auxiliary oxygen detoxifying mechanism in elaterid larvae. *Free Radical Biology and Medicine* **1988**, *24*, 767. [[CrossRef](#)]

⁶² Barros, M. P.; Bechara, E. J. H. Daily variations of antioxidant enzyme and luciferase activities in the luminescent click-beetle *Pyrearinus termitilluminans*: cooperation against oxygen toxicity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2001**, *31*, 393. [[CrossRef](#)]

⁶³ Bechara, E. J. H.; Luminescent Elaterid Beetles. *Advances in Oxygenated Processes* **1988**, *1*, 123.

⁶⁴ Costa, C.; Vanin, S. A. Coleoptera larval fauna associated with termite nests (Isoptera) with emphasis on the "bioluminescent termite nests" from Central Brazil. *Psyche*, vol. **2010**, *2010*, ID 723947. [[CrossRef](#)]

⁶⁵ Redford, K. H. Prey attraction as a possible function of bioluminescence in the larvae of *Pyrearinus termilluminans* (Coleoptera: Elateridae). *Revista Brasileira de Zoologia* **1982**, *1*, 31. [[CrossRef](#)]

⁶⁶ Migliaccio, M. I.; Bechara, E. J. H.; Costa, C.; Vanin, S. A.; Colepicolo-Neto, P. Cupinzeiros luminescentes. *Ciência Hoje* **1985**, *16*, 92.

⁶⁷ Colepicolo Neto, P.; Bechara, E. J. H.; Ferreira, C.; Terra, W. R. Considerations of the spatial organization of digestion in the predaceous larvae of *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae). *Insect Biochemistry* **1986**, *16*, 811. [[CrossRef](#)]

⁶⁸ Reis, A.; Bechara, F. C.; Espinola, M. B.; Vieira, N. K.; Souza, L. L. Restoration of damaged land areas: using nucleation to improve successional processes. *Natureza & Conservação* **2003**, *1*, 85.

⁶⁹ Torres, M. A. Papel da trealose no metabolismo de larvas de *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae) sob estresse hídrico. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2003.

- ⁷⁰ Li, X. ; Nakajima, Y. ; Niwa, K. ; Viviani, V. R. ; Ohmiya, Y. Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging. *Protein Science* **2009**, *19*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷¹ Gabriel ,G. V.; Lopes, P. S.; Viviani, V. R. Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor. *Analytical Biochemistry* **2014**, *15*, 445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷² Alam, R.; Fontaine, D. M.; Branchini, B. R.; Maye, M. M. Designing quantum rods for optimized energy transfer with firefly luciferase enzymes. *Nano Letters* **2012**, *12*, 3251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]