

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TERMODINÂMICA DA TRANSFERÊNCIA DA CADEIA LATERAL DA ARGININA
DE ÁGUA PURA PARA SOLUÇÃO AQUOSA DE GLICEROL 0,5 MOL.L⁻¹**

MARIO DA SILVA GARROTE FILHO

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho - 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TERMODINÂMICA DA TRANSFERÊNCIA DA CADEIA LATERAL DA ARGININA
DE ÁGUA PURA PARA SOLUÇÃO AQUOSA DE GLICEROL 0,5 MOL.L⁻¹**

MARIO DA SILVA GARROTE FILHO

PRF. DR. NILSON PENHA SILVA

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho - 2005

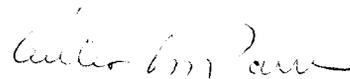
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TERMODINÂMICA DA TRANSFERÊNCIA DA CADEIA LATERAL DA ARGININA
DA ÁGUA PURA PARA SOLUÇÃO AQUOSA DE GLICEROL 0,5 MOL.L⁻¹**

MARIO DA SILVA GARROTE FILHO

Professor Dr. Nilson Penha Silva
(Instituto de Genética e Bioquímica)

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em 25/02/05



Cecília Lomônaco de Paula
Coordenadora do curso de Ciências
Biológicas

Uberlândia - MG
Julho - 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TERMODINÂMICA DA TRANSFERÊNCIA DA CADEIA LATERAL DA ARGININA
DE ÁGUA PURA PARA SOLUÇÃO AQUOSA DE GLICEROL 0,5 MOL.L⁻¹**

MARIO DA SILVA GARROTE FILHO

Aprovada pela Banca Examinadora em: 15/07/05 Nota: 100,0



Prof. Dr. Nilson Penha Silva
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Tales Alexandre Aversi Ferreira
Membro da Banca Examinadora



Prof. Dr. Otávio Luiz Bottecchia
Membro da Banca Examinadora

Uberlândia, 13 de julho de 2005

Aos meus pais Mario da Silva e Lauricesa Rosa Garrote e a minha irmã Marília da Silva Garrote pelo apoio, carinho e atenção que me têm concedido desde o início da minha jornada em direção ao futuro.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Nilson Penha Silva pela excelente orientação durante realização de todas as etapas do presente trabalho e também pelo seu apoio, confiança, sabedoria e idéias brilhantes.
- Aos pesquisadores D. W. Bolen, P. H. Yancey e P. A. Fields pelo empenho em escrever textos compreensíveis sobre estabilidade de proteínas, que permitiram a mim e a outras pessoas que também não são superespecialistas a entender esse assunto fascinante. Os artigos claros e inteligíveis que esses pesquisadores publicaram me motivaram a utilizar uma linguagem mais simples durante a redação do presente trabalho.
- Aos meus pais que têm me apoiado tanto afetivamente como financeiramente. Esse apoio foi fundamental para o desenvolvimento das pesquisas destinadas à realização dessa monografia.
- Ao Ernane Henrique Monteiro Vieira Neto pelas fotos apresentadas nessa monografia e também pela sua amizade e pelo seu apoio.
- Aos colegas de laboratório Lúbia Cristina Fonseca, Natássia Caroline Resende Corrêa e Cleine Chagas da Cunha pela amizade responsável pelo agradável ambiente de trabalho e também pela eventual colaboração durante as pesquisas.
- Aos docentes Eloísa Amália Vieira Ferro, Cecília Lomônaco de Paula e Márcia Helena Ferreira Moyses por preciosos ensinamentos e pelo apoio ao longo da minha vida acadêmica.
- Aos meus amigos Luiz A. Pontes Nogueira, Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, Angélica de Oliveira Gomes e Fabiane Moreira Mundim Ribeiro pela amizade e paciência com que tem escutado as minhas lamentações.
- A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho

RESUMO

A estabilidade de uma proteína é determinada pela solubilidade das cadeias laterais de seus aminoácidos, da temperatura e da composição do meio; ela pode ser estimada por modelagem termodinâmica a partir da composição em aminoácidos da proteína. Para subsidiar esses estudos, nós determinamos a variação de energia livre padrão de transferência ($\delta\Delta G^\circ_t$) da cadeia lateral da arginina da água para uma solução de glicerol a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, a partir dos limites de solubilidade (S) da arginina e da glicina em água (w) e em glicerol (os), determinados por refratometria. O valor de $\delta\Delta G^\circ_t$ da cadeia lateral da arginina foi obtido pela diferença entre o ΔG°_t da glicina e o ΔG°_t da arginina, os quais foram determinados pela equação $\Delta G^\circ_t = -R.T.\ln K_s$, onde $K_s = S_{os}/S_w$. Os limites de solubilidade em água e em glicerol foram respectivamente de 22,2 e 21,3 g.dL^{-1} para a glicina e de 85,8 e 81,4 g.dL^{-1} para a arginina. Esses valores foram concordantes com aqueles reportados na literatura. O valor de $\delta\Delta G^\circ_t$ foi $5,4 \text{ cal.mol}^{-1}$, indicando que a transferência do grupo δ -guanidina da água para glicerol foi ligeiramente desfavorável.

Palavras-chaves: limite de solubilidade, refratometria, energia livre de transferência.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Reagentes	15
2.2. Equipamento	15
2.3. Preparo das soluções de glicerol	15
2.4. Etapas do procedimento utilizado na realização dos experimentos	16
2.5. Local	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. Escolha dos reagentes	29
3.2. Construção do vórtex	29
3.3. Considerações acerca da realização dos experimentos	31
3.3.1. Quantidade de tubos de ensaio utilizada em cada série	31
3.3.2. Intervalo de massa	31
3.3.3. Volume de solvente utilizado no preparo das soluções de aminoácido	31
3.3.4. Incubação do solvente no banho de imersão termostatizado	32
3.3.5. Tempo de agitação dos tubos de ensaio	32
3.3.6. Vedação dos tubos de ensaio	32
3.3.7. Colocação das esferas de vidro	33
3.3.8. Controle da temperatura	33
3.3.9. Duração da incubação dos tubos de ensaio	34
3.3.10. Encaixe das esferas de vidro	34
3.3.11. Leitura do índice de refração	35
3.4. Construção dos gráficos	35
3.5. Obtenção do limite de solubilidade	36
3.6. Cálculo da massa de precipitado	37
3.7. Cálculo da energia livre de transferência	39
3.8. Redução do limite de solubilidade	41
3.9. Explicação para a redução do limite de solubilidade	41

3.9.1. Aumento do grau de hidratação do aminoácido	41
3.9.2. Competição do glicerol pelas moléculas de água do solvente	41
3.9.3. Disponibilidade de moléculas de água para a solvatação do aminoácido	42
3.10. Gráficos obtidos	42
3.11. Comparação dos nossos dados com os da literatura científica	43
3.12. Fatores que podem ter interferido nos resultados que obtivemos	43
3.12.1. Falha no método de análise dos dados	43
3.12.2. Diferença de temperatura entre o refratômetro e o banho termostático	43
3.12.3. Profundidade de inserção da pipeta para obtenção de alíquotas de solução	44
3.13. Explicação da divergência entre os erros relativos encontrados para arginina e para a glicina	44
3.13.1. Qualidade da glicina	45
3.13.2. Tempo de incubação dos tubos	45
3.14. Valores de energia livre obtidos	45
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

1. Balança analítica AND, modelo H-R 20	18
2. Refratômetro Abbe Refractometer da marca Analytik Jena AG conectado ao banho termostatizado	19
3. Pipeta automática regulável (modelo Lambate da HTC)	20
4. Pipeta automática de 25 μL (Socorex)	21
5. Banho de imersão termostatizado com refrigeração (Marconi)	22
6. Vórtex construído a partir da base de um liquidificador	23
7. Mario da Silva Garrote Filho e Lúbia Cristina Fonseca ao lado do vórtex que eles construíram	24
8. Agitação dos tubos de ensaio no vórtex	25
9. Série de 15 tubos de ensaio cobertos com esferas maciças de vidro	26
10. Tubos mergulhados no banho termostatizado ao lado de um béquer com água. A água desse béquer era usada para lavar a parte do refratômetro em que eram colocadas as alíquotas do sobrenadante para determinação do índice de refração	27
11. Luz acesa para a utilização do refratômetro	28
12. A) Vórtex sem borracha; B) Vórtex com borracha.	50
13. Painel de controle do Banho de imersão termostatizado com refrigeração (Marconi)	51
14. Exemplo de gráfico que descreve a variação do índice de refração das alíquotas do sobrenadante da solução de aminoácido	52
15. Retas de regressão linear secundárias	53
16. Intersecção entre a reta de regressão linear principal e a reta representativa do termo A2 da sigmoide	54
17. Representação do perfil de solubilidade da arginina em água pura (painel A) e em solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol (painel B) a partir do cálculo dos índices de refração para a arginina presente nas alíquotas obtidas do sobrenadante	55
18. Representação do perfil de solubilidade da glicina em água pura (painel A) e em solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol (painel B) a partir do cálculo dos índices de refração para a glicina presente nas alíquotas obtidas do sobrenadante	56

LISTA DE TABELAS

1. Limite de solubilidade (S) da arginina e da glicina em água pura e em solução de glicerol $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ 46
2. Erro relativo entre os valores de limite de solubilidade (S) obtidos por refratometria e aqueles relatados na literatura científica 47
3. Massa total (m_t) de arginina adicionada a alguns tubos contendo água pura e os correspondentes valores de índice de refração médio ($\eta_{\text{médio}}$) da alíquota do sobrenadante da solução formada por esses dois componentes, massa solubilizada (m_s), massa precipitada (m_p) calculada e a média da massa precipitada medida. 48
4. Energia livre padrão de transferência (ΔG°_t) para glicina e arginina de água pura para solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol a 25°C e energia livre padrão de transferência para a cadeia lateral ($\delta\Delta G^\circ_t$) da arginina nessas mesmas condições. 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácido
Arg	Arginina
D	<i>Ensemble</i> desenovelado
ΔG°_t	Energia livre padrão de transferência para um aminoácido
$\delta\Delta G^\circ_t$	Energia livre padrão de transferência para a cadeia lateral de um aminoácido
Gly	Glicina
K_{cat}	Constante catalítica de uma enzima
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_s	Constante de solubilidade
m_d	Massa de arginina dissolvida no sobrenadante
m_p	Massa de arginina que na forma de precipitado
m_t	Massa total de arginina
N	<i>Ensemble</i> nativo
η	Índice de refração
os	Glicerol (osmólito)
R	Constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)
S	Limite de solubilidade
S_{os}	Limite de solubilidade em solução de osmólito
S_w	Limite de solubilidade em água
T	Temperatura absoluta em Kelvin
TMAO	Óxido de trimetilaminia
w	Água (osmólito)

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são moléculas constituídas por uma seqüência de vários aminoácidos unidos por ligações peptídicas entre si. Tem-se a formação de uma estrutura denominada polipeptídeo, que ao interagir consigo mesmo e com o meio circundante, pode adquirir uma forma mais compacta e organizada. Basicamente, é como se essa estrutura fosse uma linha que pudesse ser enrolada para formar um novelo, em um processo denominado enovelamento. O processo reverso é denominado desenovelamento (NELSON; COX, 2002).

Quando o enovelamento é bem sucedido e resulta na formação de uma proteína capaz de realizar a função para a qual foi sintetizada, a proteína está no estado nativo. Por outro lado, quando a proteína não se enovela adequadamente e permanece parcialmente ou completamente inativa, ela encontra-se no estado desnaturado (NELSON; COX, 2002).

Em ambos os estados, uma proteína pode apresentar diversas conformações, que variam de acordo com o seu grau de enovelamento. Cada uma dessas possíveis estruturas corresponde ao que é chamado de microestado. Ao conjunto de microestados que corresponde a um determinado macroestado atribui-se o nome de *ensemble* (LEE, 2000). Desse modo, como os estado nativo e o estado desenovelado de uma proteína são compostos por diversos microestados, eles são normalmente referidos como *ensemble* nativo e *ensemble* desnaturado, respectivamente (WANG; ROBERTSON; BOLEN, 1995; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

A diferença de energia livre entre os microestados pode ser suficientemente pequena para que a transição de um microestado para outro ocorra com facilidade. Essa propriedade é importante nos processos que envolvem recepção, interpretação e execução de sinais biológicos pelas proteínas especializadas para desempenhar essa função (LEE, 2000). Esse é o caso da rodopsina, por exemplo, que sofre mudanças conformacionais ao participar da conversão de estímulos luminosos em sinais biológicos (NELSON; COX, 2002).

A transição de um microestado para outro também permite que uma proteína que inicialmente pertença ao *ensemble* nativo seja transferida para o *ensemble* desnaturado, e vice versa. Essa transição pode ser reversível sob determinadas condições. Quando isso acontece, estabelece-se um equilíbrio entre o *ensemble* nativo e o *ensemble* desnaturado (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; NOSOH; SEKIGUCHI, 1990), conforme mostrado pela Equação 1:



O *ensemble* nativo e o *ensemble* desnaturado diferem entre si no que se refere à quantidade de microestados e ao grau de compactação das estruturas correspondentes a esses microestados. O *ensemble* desnaturado possui uma quantidade maior de microestados quando comparado ao *ensemble* nativo. Além disso, os microestados do *ensemble* desnaturado, em geral, apresentam menor grau de compactação. Com isso, o *ensemble* desnaturado de uma proteína pode exibir uma maior variedade de possíveis conformações, o que confere a esse *ensemble* uma maior entropia conformacional (TANFORD, 1962; NOSOH; SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN; TOOZE, 1991; BASKAKOV; BOLEN, 1998; QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

Devido a essa diferença de entropia conformacional, seria mais provável que uma proteína se mantivesse no *ensemble* desnaturado em detrimento do *ensemble* nativo. Isso seria um grande empecilho para a existência de proteínas funcionais. Associado à entropia conformacional tem-se a ação de forças decorrentes da interação entre as moléculas de água e as cadeias laterais dos aminoácidos que integram a estrutura de uma proteína. Essa interação depende da polaridade da cadeia lateral do aminoácido (BRANDEN; TOOZE, 1991; NELSON; COX, 2002).

As cadeias laterais polares dissolvem-se relativamente bem em água e são por isso classificadas como hidrofílicas, já que têm a mesma polaridade da água. No entanto, o mesmo não acontece com as cadeias laterais apolares, cuja interação com a água é de repulsão. Por isso, tais aminoácidos são classificados como hidrofóbicos (NELSON; COX, 2002).

A solubilidade de um composto em um solvente aquoso está relacionada com a quantidade de ligações de hidrogênio que podem ser formadas entre esse composto e as moléculas de água do solvente (NELSON; COX, 2002).

Os aminoácidos não se dissolvem em água tão bem quanto as próprias moléculas de água. Isso acontece porque há a formação de mais ligações de hidrogênio entre as moléculas de água do solvente do que entre essas moléculas e um aminoácido. Além disso, a quantidade de ligações de hidrogênio que podem ser estabelecidas entre as moléculas de água e os aminoácidos será ainda mais reduzida quando o aminoácido for apolar. Em consequência disso, as moléculas de água que circundam os aminoácidos polares e apolares formam mais ligações de hidrogênio entre si. Com isso, há uma restrição da mobilidade dessas moléculas de água, que então se organizam e formam um envoltório ao redor do aminoácido. Esse envoltório é denominado camada de hidratação (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; YANCEY et al., 1982; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; TSAI; GERSTEIN; LEVITT, 1996).

A maior organização das moléculas de água da camada de hidratação implica em uma redução da entropia (medida da desordem de um sistema) dessas moléculas e um aumento de energia livre. Uma elevação na energia livre torna o processo desfavorável, pois o conteúdo de energia livre de um sistema tende a diminuir espontaneamente com o decorrer do tempo. Essa redução de energia livre permite que o sistema alcance uma maior estabilidade, que pode ser entendida como a tendência de um sistema de permanecer inalterado. Por outro lado, se o conteúdo de energia livre de um sistema torna-se maior, há um aumento da probabilidade de ocorrência de transformações nesse sistema, resultando em uma diminuição da sua estabilidade (ATKINS, 1999).

O aumento de energia livre decorrente da formação da camada de hidratação é proporcional à extensão dessa camada. Além disso, esse aumento de energia livre é maior para cadeias laterais apolares (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; NELSON; COX, 2002).

Todas as possíveis conformações de uma proteína podem ser envolvidas por uma camada de hidratação. No entanto, como as conformações pertencentes ao *ensemble* desnaturado são normalmente menos compactas, as proteínas desse *ensemble* terão uma maior superfície de exposição ao solvente aquoso. Em consequência disso, a camada de hidratação que envolve essas proteínas terá maior extensão e, portanto, a sua formação estará vinculada a uma maior elevação de energia livre. Já no *ensemble* nativo, devido a maior compactação das possíveis conformações, a camada de hidratação terá menor extensão e a isso estará relacionado um menor aumento de energia livre (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989).

Conforme se pode perceber, em ambos os *ensembles* haverá aumento da energia livre, o que aumenta a instabilidade do sistema formado pela proteína e a camada de hidratação ao seu redor. Essa instabilidade será ainda maior caso esse sistema possua uma proteína pertencente ao *ensemble* desnaturado, pois nesse caso o potencial químico (energia livre molar) do sistema será maior. Para que uma maior estabilidade seja alcançada, as conformações do *ensemble* desnaturado tornam-se mais compactas. Esse mecanismo visa diminuir a superfície da proteína em contato com o solvente e assim reduzir o tamanho da camada de hidratação. Quando isso acontece, o número de moléculas de água necessária para constituir a camada de hidratação torna-se menor e algumas moléculas de água tornam-se excedentes e são então liberadas, resultando em uma diminuição do conteúdo de energia livre do sistema (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; TSAI et al., 1996).

O mecanismo de compactação de uma proteína não consiste simplesmente em uma redução do seu volume e, conseqüentemente, da área superficial exposta ao solvente. Nesse processo de contração, a estrutura tridimensional da proteína se modifica de tal modo a isolar as cadeias laterais de aminoácidos apolares do contato com as moléculas de água do solvente aquoso, limitando assim o aumento de energia livre decorrente da formação da camada de hidratação em torno dessas cadeias laterais (BRANDEN; TOOZE, 1991; NELSON; COX, 2002).

As cadeias laterais hidrofóbicas são reunidas no interior da estrutura tridimensional da proteína mediante o que é denominado de interação hidrofóbica. Essa interação, ao contrário do que possa parecer, não acontece devido à atração entre as cadeias hidrofóbicas. Na verdade, tal interação é decorrente da força de repulsão que surge quando estão em contato com um solvente aquoso. É como se as moléculas de água forçassem as cadeias laterais dos aminoácidos apolares a ficarem juntas. A essa ação atribui-se o nome de efeito hidrofóbico (NOSOH; SEKIGUCHI, 1990; BOLEN; BASKAKOV, 2001; NELSON; COX, 2002).

A tendência das cadeias laterais dos aminoácidos apolares em se manterem próximas impulsiona o processo de enovelamento e resulta na formação de uma proteína cuja estrutura tridimensional é constituída por uma região central na qual essas cadeias laterais se concentram. Essa região é denominada de núcleo hidrofóbico (BRANDEN; TOOZE, 1991; NELSON; COX, 2002).

Tanto as cadeias laterais de aminoácidos polares como as de aminoácidos apolares são rodeadas por uma camada de hidratação quando mergulhadas em um solvente aquoso. Por isso, ambas induzem a um aumento do conteúdo de energia livre do sistema. No entanto, esse aumento é maior no caso das cadeias laterais de aminoácidos apolares. Como esses dois tipos de cadeias laterais não podem ser protegidas do contato com o solvente simultaneamente, é preferível esconder as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos, pois desse modo pode-se alcançar uma estabilidade maior do que aquela que seria obtida caso ocorresse o inverso (NELSON; COX, 2002).

Dependendo do grau de compactação induzido pela formação da camada de hidratação, uma proteína que antes tinha uma conformação correspondente a um dos microestados do *ensemble* desnaturado poderá modificar-se de tal modo a se tornar uma proteína do *ensemble* nativo. Portanto, o aumento de energia livre originado da camada de hidratação favorece o deslocamento do equilíbrio entre os *ensembles* nativo e desenovelado (Equação 1) em direção ao *ensemble* nativo, que é, dessa forma, estabilizado (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; BASKAKOV; BOLEN, 1998). Além disso, há um aumento da diferença

de energia livre entre esses dois *ensembles* que dificulta a transição de uma proteína do *ensemble* nativo para o *ensemble* desnaturado. Isso também contribui para a estabilização das proteínas do *ensemble* nativo (BRANDEN; TOOZE, 1991; NELSON; COX, 2002).

A energia livre envolvida no encolhimento da camada de hidratação do *ensemble* desnaturado é mais do que suficiente para compensar a maior entropia conformacional relacionada a esse *ensemble* e, desse modo, permitir a existência de proteínas funcionais, que são indispensáveis à vida. No entanto, a diferença de energia livre entre os *ensembles* não é devidamente grande para impedir que as proteínas do *ensemble* nativo sofram mudanças conformacionais, as quais podem resultar no processo de desnaturação. Portanto, diz-se que o *ensemble* nativo possui estabilidade marginal (BRANDEN; TOOZE, 1991; SOMERO, 2003).

A baixa estabilidade do *ensemble* nativo torna as proteínas desse *ensemble* suscetíveis a mudanças conformacionais, o que confere à estrutura dessas proteínas uma certa flexibilidade. Aparentemente isso é danoso para as proteínas, pois poderiam resistir melhor aos efeitos da desnaturação térmica se tivessem uma maior estabilidade, que estaria relacionada a uma estrutura mais rígida. No entanto, é necessário que as proteínas sejam dotadas de flexibilidade estrutural, pois caso contrário, essas moléculas não poderiam participar de diversos processos biológicos que requerem mudanças conformacionais, como é o caso de reações de catálise promovidas por enzimas (FIELDS, 2001; NELSON; COX, 2002; SOMERO, 2003).

Além disso, cada proteína deve ser provida da estabilidade necessária para o cumprimento de sua tarefa no complexo e dinâmico ambiente interno dos organismos vivos. Uma estabilidade excessivamente elevada da β -hidroxi- β -metil-glutaril-CoA-redutase, enzima chave na biossíntese de colesterol, poderia levar à produção além do necessário daquele lipídeo, determinando hipercolesterolemia (MURRAY et al., 1994).

A catálise enzimática envolve a ligação de um substrato ao sítio ativo da enzima, que é a região da enzima na qual a reação de catálise ocorre. Essa ligação é bastante específica e a facilidade com que ocorre está relacionada ao encaixe entre o sítio ativo e o substrato (NELSON; COX, 2002). A afinidade de uma enzima pelo seu substrato é medida pelo K_m , que corresponde à metade da concentração do substrato necessária para tornar uma enzima completamente saturada pelo substrato. Assim, valores menores de K_m estão relacionados a uma maior afinidade reacional entre enzima e substrato. Os valores de K_m aumentam com a elevação da temperatura, em decorrência da intensificação da energia vibracional dos grupamentos que constituem o sítio ativo da enzima, o que promove alterações na

conformação e na própria capacidade de ligação do sítio ativo com o substrato (FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

Os organismos que vivem em ambientes de temperatura elevada requerem enzimas com maior estabilidade, ao contrário daqueles que são adaptados a temperaturas menores. Assim, a flexibilidade de uma enzima varia inversamente com a temperatura. Isso se reflete no valor da constante catalítica (K_{cat}), que expressa a taxa com que as moléculas de substrato são convertidas em produto por segundo por unidade de sítio ativo, pois as reações de catálise dependem de mudanças conformacionais da enzima. E para que essas mudanças conformacionais se efetivem, a enzima precisa ser dotada de certo grau de flexibilidade (FIELDS, 2001; NELSON; COX, 2002; SOMERO, 2003). Em decorrência disso, os ortólogos (enzimas de diferentes espécies que derivam de um ancestral comum) de organismos adaptados a ambientes quentes possuem valores de K_{cat} menores do que aqueles adaptados a locais mais frios (FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

A vida pode ser mantida em temperaturas que vão do calor intenso ao frio extremo. Os organismos que conseguem sobreviver em ambientes cuja temperatura é bastante elevada são denominados termofílicos, enquanto que aqueles capazes de se desenvolver em locais extremamente frios são denominados psicofílicos. As proteínas desses organismos diferem entre si em alguns aspectos, como é o caso do conteúdo de glicina e prolina. Foi constatado que as proteínas dos termofílicos possuem uma quantidade maior de prolina em detrimento de glicina. Nos psicofílicos foi observado o inverso. Isso está relacionado ao fato de que a liberdade conformacional da prolina é menor do que a da glicina. O maior conteúdo de prolina nas proteínas dos termofílicos permite a formação de uma estrutura mais rígida o suficiente para enfrentar os efeitos do aquecimento (BRANDEN; TOOZE, 1991; FIELDS, 2001; LESK, 2003; SOMERO, 2003).

Se os níveis de prolina das proteínas dos psicofílicos fossem tão altos como o dos termofílicos, as suas proteínas seriam demasiadamente rígidas, prejudicando ou mesmo impedindo as reações de catálise realizada pelas enzimas desses organismos. Por isso, as proteínas dos psicofílicos possuem uma maior quantidade de glicina em detrimento de prolina. As variações relacionadas à composição e posição de aminoácidos ocorreram ao longo do processo evolutivo e por isso são chamadas de adaptações intrínsecas, pois se processaram dentro da estrutura da proteína. Portanto, as diferenças entre as proteínas de termofílicos e psicofílicos quanto ao conteúdo de glicina e prolina são um exemplo de adaptação intrínseca (FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

Outro exemplo de adaptação intrínseca envolvendo as proteínas de termofílicos e psicofílicos está relacionado à quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, que é maior nas proteínas dos termofílicos. Isso está relacionado ao fato de que o efeito hidrofóbico é reduzido com a diminuição da temperatura, pois em temperaturas mais baixas as moléculas de água que estão livres no solvente tornam-se mais organizadas. Assim, a diminuição de energia livre decorrente da dissolução parcial ou total da camada de hidratação é menor e poderia não ser suficiente para compensar a elevada entropia conformacional do *ensemble* desnaturado. Desse modo, a menor quantidade de resíduos hidrofóbicos das proteínas dos psicofílicos pode ser decorrente simplesmente da redução da utilidade (FIELDS, 2001) ou da necessidade desses resíduos na estabilização das proteínas desses organismos. Em baixas temperaturas, a baixa energia vibracional térmica dos grupos da proteína torna mais difíceis os eventos transconformacionais necessários para o exercício da função protéica, de tal forma que a proteína naturalmente deveria de fato compensar esse efeito da temperatura com a diminuição da intensidade das forças que estabilizam seu estado nativo. Assim, faz sentido o fato de um organismo psicofílico apresentar menor teor de cadeias laterais hidrofóbicas de aminoácidos.

Além disso, há também as adaptações extrínsecas. Nesse caso, a estrutura de uma proteína é afetada por modificações do meio em que está dissolvida. Isso é o que acontece com a adição de osmólitos à solução na qual a proteína está imersa (FIELDS, 2001; SOMERO, 2003). Os osmólitos são compostos orgânicos de baixo peso molecular e recebem esse nome porque são substâncias osmoticamente ativas. Há osmólitos que agem como caotrópicos e outros que atuam como cosmotrópicos, caso promovam a diminuição ou o aumento da estabilidade do *ensemble* nativo, respectivamente. Os osmólitos cosmotrópicos podem ser classificados como solutos compatíveis ou neutralizantes (YANCEY et al., 1982).

Os osmólitos compatíveis são aqueles que protegem as proteínas contra inativação ou desnaturação sem perturbar a atividade funcional das mesmas em temperaturas fisiológicas. Os osmólitos neutralizantes, por outro lado, alteram a atividade biológica de uma proteína de modo a se opor aos efeitos deletérios da uréia ou de outras substâncias caotrópicas sobre o *ensemble* nativo (YANCEY et al., 1982; ANJUN, RISHI, AHMAD, 2000).

No caso de enzimas, os osmólitos compatíveis, como é o caso do glicerol, têm pouco ou nenhum efeito sobre os valores de K_m e K_{cat} . Já os osmólitos neutralizantes, que podem ser exemplificados pelo óxido de trimetilamina [TMAO], promovem a diminuição dos valores de K_m e aumento dos valores de K_{cat} de uma enzima para combater a ação de substâncias caotrópicas, as quais atuam de modo inverso sobre os valores de K_m e de K_{cat} (YANCEY et al., 1982; WANG; BOLEN, 1997; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

Os osmólitos compatíveis e os neutralizantes também diferem entre si quanto ao tipo de estresse sobre o qual atuam. Os osmólitos compatíveis são requisitados para combater os efeitos nocivos de altas temperaturas, concentrações elevadas de sal e escassez de água sobre as proteínas do *ensemble* nativo. Já os osmólitos neutralizantes são empregados para compensar a ação de substâncias caotrópicas, como é o caso da uréia. Como os osmólitos de cada uma dessas categorias atuam sobre tipos diferentes de estresse, seria de se esperar que protegessem as proteínas do *ensemble* nativo mediante mecanismos distintos (BOLEN, 2004).

Estudos realizados por Timasheff e colaboradores revelaram que há menos moléculas de glicerol ligadas às proteínas do *ensemble* desnaturado do que do *ensemble* nativo, de modo que a diferença do número de moléculas de glicerol ligadas a cada um desses *ensembles* resulta em um número negativo, o que significa que as moléculas de glicerol são preferencialmente excluídas da superfície de uma proteína do *ensemble* desnaturado. Quando isso acontece, o glicerol deixa para trás uma camada enriquecida de moléculas de água, que atuam na formação da camada de hidratação. Isso resulta em um aumento de energia livre, fazendo com que a interação entre uma proteína e o glicerol seja termodinamicamente desfavorável (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989).

Dados obtidos por estudos de dinâmica molecular, que envolvem simulações computacionais, também mostraram que o glicerol é, de fato, excluído da superfície das proteínas, o que corrobora as descobertas realizadas por Timasheff e colaboradores. Acredita-se que esse mesmo mecanismo seja válido para outros osmólitos (KANG; YOU; JHON, 1995).

A presença de glicerol promove um maior aumento do potencial químico das proteínas do *ensemble* desnaturado do que daquelas que pertencem ao *ensemble* nativo. Isso acontece porque as proteínas do *ensemble* desnaturado possuem maior superfície de exposição ao solvente e por isso a camada de hidratação que se forma ao redor delas tem maior extensão, o que está associado a uma maior quantidade de energia livre. Isso aumenta ainda mais a diferença de energia livre entre os *ensembles* nativo e desenovelado, de modo a dificultar a transição de proteínas do *ensemble* nativo para o desnaturado. No entanto, o processo reverso é favorecido, pois implica em uma redução da camada de hidratação e, conseqüentemente, resulta em uma diminuição do potencial químico da proteína. Isso corresponde ao deslocamento do equilíbrio entre os *ensembles* nativo e desenovelado em direção ao *ensemble* nativo (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; ANJUM; RISHI; AHMAD, 2000; RISHI et al., 1998; BOLEN, 2004).

Além disso, o contato das cadeias laterais apolares com a mistura água-glicerol é ainda mais desfavorável do que aquele apenas com a água. A repulsão entre o glicerol e essas cadeias laterais é mútua. No entanto, como tais cadeias laterais pertencem a aminoácidos que estão ligados à proteína, seria necessário que a proteína se movesse para que essas cadeias laterais pudessem se afastar do glicerol. Como a massa de uma molécula de glicerol é muito menor do que a de uma proteína em geral, isso significa que o glicerol tem menor inércia e por isso pode ser deslocado mais facilmente. O efeito resultante é a exclusão do glicerol da superfície da proteína (GEKKO; TIMASHEFF, 1981).

Devido ao fato de que as cadeias laterais apolares serem predominantemente expostas em proteínas do *ensemble* desnaturado, isso significa que seriam mais abundantes as interações desfavoráveis entre essas cadeias laterais e as moléculas de glicerol. Esse seria outro fator que explicaria a maior elevação no potencial químico constatada pelas proteínas do *ensemble* desnaturado (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989). Em contrapartida, o glicerol é um composto hidrofílico e tem bastante afinidade pelas cadeias laterais polares (GEKKO; TIMASHEFF, 1981).

A interação entre o glicerol e uma proteína não é específica, pois ocorre apenas quando as concentrações desse osmólito são altas (GEKKO; TIMASHEFF, 1981). No entanto, concentrações demasiadamente elevadas de glicerol podem ser prejudiciais às proteínas, porque torná-las-iam estáveis demais e isso aumentaria o custo energético para a ocorrência de reações de catálise ou de outros processos que requerem mudanças conformacionais das proteínas envolvidas (FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

O contato entre o glicerol ou outro osmólito e uma proteína é responsável pelo efeito solvofóbico, que é decorrente da interação desfavorável entre um componente da solução (glicerol) e um componente da proteína (cadeias laterais hidrofóbicas) (TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989). Entretanto, devido à importância dos osmólitos na estabilização de proteínas do *ensemble* nativo em condições adversas e assim contribuindo para a sobrevivência de vários seres vivos, Bolen e colaboradores têm preferido denominá-lo de efeito osmofóbico (BOLEN; BASKAKOV, 2001; BOLEN, 2004).

Experimentos envolvendo energia livre de transferência, conduzidos por Bolen e colaboradores, mostraram que a interação dos osmólitos cosmotrópicos com as cadeias laterais tanto polares como apolares envolvia um menor aumento de energia livre do que quando expostas à água apenas. Portanto, a transferência de tais cadeias da água pura para uma solução de osmólito seria um processo favorável, pois estaria associado a uma redução de energia livre. No entanto, para o esqueleto peptídico foi constatado o contrário, ou seja,

esse componente das proteínas apresenta maior energia livre quando está presente em uma solução de osmólito do que na água pura. Assim, a transferência do esqueleto peptídico da água pura para uma solução de osmólito seria um processo desfavorável e o aumento de energia livre decorrente é mais do que suficiente para compensar a redução de energia livre promovida pelo contato das cadeias laterais com os osmólitos. Portanto, na estabilização das proteínas do *ensemble* nativo por osmólitos, o esqueleto peptídico desempenha um papel dominante (LIU; BOLEN, 1995; WANG; ROBERTSON; BOLEN, 1995; WANG; BOLEN, 1997; QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

Essa mesma técnica também foi usada para estudar o comportamento das cadeias laterais e do esqueleto peptídico na presença de uréia. Os dados obtidos evidenciaram que a transferência de cada um desses componentes para uma solução de uréia é um processo favorável. Portanto, uréia e osmólitos diferem entre si quanto à ação que exercem sobre o esqueleto peptídico (WANG; BOLEN, 1997; BOLEN; BASKAKOV, 2001).

Estudos de dinâmica molecular revelaram que a uréia promoveu a liberação de algumas moléculas de água da camada de hidratação que cobria uma esfera hidrofóbica. Isso resultou na diminuição da energia livre envolvida na manutenção da camada de hidratação, o que significa que a uréia diminui os custos energéticos associados à formação da camada de hidratação, de modo a estabilizar as conformações parcialmente ou totalmente desenoveladas do *ensemble* desnaturado (TSAI et al., 1996). Apesar de promover a desnaturação de proteínas, a uréia pode ser benéfica, pois é importante na inativação reversível de enzimas do metabolismo energético de determinados organismos vivos durante a estivação (YANCEY et al., 1982).

A arginina também é capaz de desnaturar proteínas e esse efeito deve-se ao fato de se ligar fracamente às proteínas do *ensemble* desnaturado quando presente em concentrações mais elevadas. Esse efeito desnaturante da arginina não é inesperado, pois a cadeia lateral da arginina contém o grupamento δ -guanidina, cujos sais, como o hidrocloreto de guanidina é um potente agente desnaturante de proteínas. Por outro lado, é da cadeia lateral da arginina que é formada a uréia, outro potente agente desnaturante de proteínas, na reação do ciclo da uréia catalisada pela enzima arginase. Estudos conduzidos por Ahmad e colaboradores revelaram que a ação desnaturante da arginina diminui com a redução do pH, pois com isso aumentam-se as cargas positivas da proteína, resultando na repulsão elétrica da arginina, que também é positiva quando o pH é diminuído (RISHI et al., 1998)

A evolução de certos organismos vivos tem favorecido o surgimento de sistemas para combater os efeitos da arginina e outros aminoácidos sobre a estabilidade das proteínas do

ensemble nativo (YANCEY et al., 1982; YANCEY, 2004). No caso da arginina livre, determinados seres vivos dispõem da octopina desidrogenase, que é uma enzima que converte arginina em octopina, que é um osmólito compatível (YANCEY et al., 1982; RISHI et al., 2000)

Experimentos evidenciaram que o TMAO aumenta o potencial químico de uma proteína, enquanto que a uréia o diminui. Já o potencial químico decorrente do contato de uma proteína com uma solução contendo esses dois solutos é quase uma soma algébrica das contribuições de energia livre de cada um separadamente. Assim, o efeito da mistura desses dois solutos é aditivo e isso explica porque o TMAO é classificado como um osmólito neutralizante (YANCEY et al., 1982; WANG; BOLEN, 1997; QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

Inclusive, se as concentrações de TMAO nos organismos que utilizam esse osmólito para combater os efeitos danosos da uréia fosse mantida na ausência de uréia, o TMAO seria prejudicial às proteínas, afetando principalmente as enzimas metabólicas. Isso aconteceria porque essas enzimas possuem uma elevada taxa de renovação (turnover) e por isso são continuamente sintetizadas e destruídas. Para que possam ser degradadas, essas enzimas devem ser desenoveladas. No entanto, o aumento de energia livre decorrente da ação do TMAO ou de outro osmólito dificultaria a ocorrência desse processo e poderia comprometer as vias metabólicas que dependem dessas enzimas (ANJUM; RISHI; AHMAD, 2000).

Similarmente ao efeito hidrofóbico, o efeito osmofóbico origina-se de interações desfavoráveis entre um componente estrutural da proteína e um componente da solução e por isso possuem bases conceituais semelhantes. No efeito hidrofóbico, as interações ocorrem entre cadeias laterais hidrofóbicas e moléculas de água, enquanto que no efeito osmofóbico as interações envolvem o esqueleto peptídico e uma solução de osmólito. Além disso, o efeito osmofóbico é considerado uma força complementar na estabilização das proteínas do *ensemble* nativo, pois surgiu com o decorrer da seleção natural bem depois que os processos de enovelamento de proteínas haviam se estabelecido (BOLEN; BASKAKOV, 2001).

A habilidade dos osmólitos em proteger as proteínas do *ensemble* nativo contra a desnaturação é genérica e independe da história evolutiva dessas proteínas. Assim, uma proteína não precisa necessariamente evoluir na presença de um determinado osmólito para que possa ser estabilizada por esse osmólito. A ação genérica dos osmólitos permite que proteínas diferentes sejam estabilizadas pelo mesmo osmólito, de modo que a quantidade de osmólitos que estão disponíveis na natureza com essa finalidade seja reduzida. Assim, um pequeno conjunto de osmólitos pode estabilizar um vasto grupo de proteínas (YANCEY et al. 1982; YANCEY, 1984). Isso é possível porque os osmólitos atuam sobre o esqueleto

peptídico, que é comum em todas as proteínas. As cadeias laterais, por outro lado, variam de uma proteína para outra quanto à polaridade, quantidade e posição relativa (BOLEN; BASKAKOV; 2001; WANG, BOLEN, 1997; BOLEN, 2004).

As proteínas de organismos cuja concentração de uréia é elevada são tão suscetíveis aos efeitos deletérios desse caotrópico quanto aquelas típicas de organismos com níveis de uréia menores. Por outro lado, as proteínas de organismos que não produzem osmólitos podem ser estabilizadas por esses solutos mesmo que não tenham tido um contato prévio com eles durante a sua história evolutiva. Isso significa que a presença de osmólitos não tem interferido na evolução intrínseca das proteínas (YANCEY et al., 1982; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

Além disso, o acúmulo de osmólitos por diversos seres vivos tem sido favorecido ao longo da seleção natural porque tem evitado que esses seres vivos precisem modificar todo o seu repertório de proteínas em virtude de mudanças ambientais transientes ou não, como é o caso de alterações sazonais que envolvem a elevação ou a redução da temperatura a níveis que seriam prejudiciais à manutenção da atividade normal de uma proteína. Como as proteínas são sintetizadas a partir de informações codificadas nos genes, a utilização dos osmólitos tem permitido que os organismos que dependem desses solutos tenham um conjunto genético com uma menor quantidade de genes e que por isso seria mais simples. Desse modo, não teriam que sintetizar proteínas diferentes para cada tipo de estresse ambiental. Quando esses organismos se deparam com uma elevação de temperatura, por exemplo, poderiam lidar com esse problema aumentando a produção de osmólitos, já que a ação desses solutos esta diretamente relacionada à concentração dos mesmos. Isso permite que muitos organismos sejam capazes de ocupar diferentes nichos térmicos (YANCEY et al. 1982; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003; YANCEY, 2004).

A simplicidade genética proporcionada pela utilização dos osmólitos permite que os seres vivos se ajustem melhor às adversidades ambientais, conferindo-lhes maior aptidão para se adaptarem ao meio em que vivem, também sendo importante na conquista de novos ambientes. Além disso, permite que sejam capazes de se adequar mais rapidamente a novas condições ambientais, já que o surgimento de proteínas que antes não existiam no organismo depende de mutações ao acaso que são favorecidas pela seleção natural, que é um processo que geralmente tem a duração de milhares de anos (YANCEY et al. 1982; FIELDS, 2001).

A existência de osmólitos em um ser vivo requer genes para codificar as vias de geração e degradação desses solutos. No entanto, seriam necessários muito mais genes se esse organismo não dispusesse dos osmólitos para lidar com alterações das condições ambientais.

Portanto, a manutenção dos osmólitos ainda assim é vantajosa para os organismos vivos (YANCEY et al. 1984).

Entretanto, há certos tipos de halobactérias que conseguem viver em ambientes com níveis de sal elevados sem a utilização de osmólitos. Inclusive, as proteínas dessas bactérias requerem altos níveis de sais, em especial de KCl e NaCl, para estarem ativas. Isso tem restringido essas bactérias a ambientes nos quais a concentração de sal é bem maior do que o aquela que seria normal para outros tipos de bactérias (YANCEY et al., 1982; YANCEY, 2004).

O efeito dos osmólitos sobre a distribuição dos microestados do *ensemble* nativo é pequeno em temperaturas fisiológicas e por isso tendem a conservar os microestados desse *ensemble*. Isso explica porque os osmólitos interferem pouco na atividade de uma proteína. Os osmólitos agem principalmente sobre o *ensemble* desnaturado, que é então contraído devido à redução de microestados que o compõem. Isso acontece porque o aumento de energia livre decorrente da presença das proteínas em solução de osmólito é diretamente proporcional à superfície da proteína exposta ao solvente. Com isso, os osmólitos favorecem o predomínio de microestados que correspondem a conformações mais compactas, que são típicas do *ensemble* nativo, em detrimento daqueles que estão relacionados a estruturas enoveladas de forma mais randômica, que caracterizam o *ensemble* desnaturado. Portanto, há uma redução dos microestados do *ensemble* desnaturado que são acessíveis para a estrutura de uma proteína. O aumento da temperatura ou a presença de uréia provocaria um efeito oposto sobre a distribuição dos microestados do *ensemble* desnaturado (WANG; ROBERTSON; BOLEN, 1995; SOMERO, 2003).

A contração do *ensemble* desnaturado resulta em uma diminuição da entropia conformacional desse *ensemble*, pois implica em uma menor quantidade de microestados energeticamente disponíveis à estrutura de uma proteína, pois as conformações mais desenoveladas seriam demasiadamente caras quanto ao conteúdo de energia livre, a ponto de se tornarem praticamente inacessível em uma dada temperatura. Essa contração é diretamente proporcional ao aumento de energia livre, que é um indicativo da efetividade dos osmólitos, pois são mais efeitos aqueles que, em uma concentração estabelecida, promovem uma maior elevação do conteúdo de energia livre de uma proteína (BOLEN; BASKAKOV, 2001; QU; BOLEN; BOLEN, 1998; BOLEN, 2004).

Com a redução da entropia conformacional do *ensemble* desnaturado, há o predomínio das conformações mais compactas, nas quais as cadeias laterais apolares estão mais juntas. A maior proximidade dessas cadeias laterais favorece o estabelecimento de interações

hidrofóbicas que auxiliam no processo de enovelamento porque tendem a aumentar a densidade do núcleo hidrofóbico da proteína (QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

A redução do *ensemble* desnaturado depende de alguns fatores, como a eficácia e a concentração do osmólito, além da presença de outro estresse desnaturante intracelular, pois tal estresse poderia enfraquecer o efeito osmofóbico (BOLEN, 2004).

Os osmólitos são importantes para aumentar o tempo de estocagem e transporte das proteínas. Tem-se preferido a utilização dos osmólitos em detrimento do congelamento e da liofilização, que são técnicas tradicionalmente empregadas com essa mesma finalidade. No entanto, os osmólitos têm a vantagem de conservar a atividade de uma proteína, enquanto que a redução de temperatura decorrente do congelamento ou a remoção de água resultante da liofilização podem provocar a desnaturação irreversível de uma proteína. Isso poderia acontecer porque ao longo da seleção natural foram favorecidas as proteínas que atuam em temperaturas amenas e na presença de água (LEE, 2000).

Outra aplicação dos osmólitos está na cristalização de proteínas, porque tais solutos são capazes de aumentar a precipitação de proteínas sem desnaturá-las. Isso acontece porque os osmólitos hidratam uma proteína mediante a formação de uma camada de hidratação. A eficácia dos osmólitos como precipitantes de proteínas é diretamente proporcional ao grau de hidratação provocado, que por sua vez está relacionado à solubilidade da proteína. A precipitação das proteínas ocorre porque o contato entre essas moléculas obstrui áreas da superfície das mesmas. Isso reduz a extensão da camada de hidratação formada, que é uma situação favorável termodinamicamente (BOLEN, 2004).

EXPLICAR MAIS DETALHADAMENTE SOBRE OS MÉTODOS UTILIZADOS POR OUTROS AUTORES

O presente trabalho teve o objetivo de obter os limites de solubilidade da arginina e da glicina em água pura e em solução de glicerol $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ mediante a utilização de refratometria, para que então fosse possível calcular a energia livre de transferência da cadeia lateral da arginina da água pura para a referida solução de glicerol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Utilizamos a L-arginina monoclóridato P. A. (ArgHCL) fabricada pela Labsynth, com grau de pureza igual a 99,90%. A glicina utilizada que utilizamos foi produzida pela empresa ISOFAC e possuía pureza de aproximadamente 98,0%. O glicerol que utilizamos era do tipo ACS, com pureza superior a 95,5% e foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich. Os valores de pureza citados para esses reagentes são aqueles indicados pelo fabricante.

2.2. Equipamento

A água que utilizávamos nos experimentos, inclusive na preparação das soluções de glicerol, era desionizada no desionizador da marca Permuton. Realizávamos as medidas de massa em uma balança de precisão AND, modelo H-R 20 (Figura 1). Efetuamos medições de índice de refração no refratômetro Abbe Refractometer da marca Analytik Jena AG (Figura 2). As alíquotas de solvente eram coletadas com o auxílio da pipeta automática regulável Labmate da HTC (Figura 3) e então adicionada aos tubos de ensaio contendo aminoácidos. Obtínhamos alíquotas do sobrenadante das soluções formadas pela mistura do aminoácido com o solvente utilizando uma pipeta automática de 25 µL Socorex (Figura 4). O controle da temperatura foi promovido pelo banho de imersão termostático com refrigeração Marconi (Figura 5). Agitávamos os tubos que continham soluções de aminoácidos utilizando um vórtex (Figura 6) que foi construído em conjunto por mim, Mario da Silva Garrote Filho, e pela Professora Mestre Lúbia Cristina Fonseca (Figura 7). Na época, a Lúbia e eu realizávamos pesquisas no Laboratório de Enzimologia para a obtenção do limite de solubilidade de aminoácidos.

2.3. Preparo das soluções de glicerol

Apesar de o glicerol ser um líquido a temperatura ambiente, esse álcool é demasiadamente viscoso para que pudesse ter sido pipetado com as pipetas automáticas disponíveis no nosso laboratório. Para o preparo das soluções de glicerol, calculávamos a

massa de glicerol que deveria ser dissolvida em um volume estabelecido, de modo que a solução resultante tivesse concentração de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida, usando um pequeno copo descartável de plástico, pesávamos a massa de glicerol até que fosse atingido um valor próximo ou igual ao que havíamos calculado. Caso a massa pesada diferisse significativamente do valor desejado, recalculávamos o volume de água no qual essa massa seria adicionada para que sempre obtivéssemos uma solução de glicerol $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Fazíamos isso porque, com a utilização das pipetas automáticas, era muito mais prático pipetar água do que obter o peso ideal de glicerol em balanças analíticas.

2.4. Etapas do procedimento utilizado na realização dos experimentos

1. Seleccionávamos de 15 tubos de ensaio para a formação de uma série experimental. Os tubos escolhidos eram posteriormente enumerados. Esses tubos tinham tamanho e diâmetro interno iguais aproximadamente a 7,5 e 1,0 cm, respectivamente.
2. Pesávamos massas crescentes de arginina e de glicina, que adicionávamos a partir do segundo tubo em séries distintas, pois o primeiro tubo seria o padrão e conteria apenas solvente (água pura ou solução de glicerol $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$). Para a arginina, o aumento de massa de um tubo para outro era de 0,05 g e para a glicina, de 0,02 g.
3. Incubávamos o solvente (água pura ou solução de glicerol $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) em banho termostatizado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. Com o uso de uma pipeta automática, adicionávamos água pura ou solução de glicerol às séries contendo arginina ou glicina. O volume de solvente pipetado para as séries de arginina e glicina era diferente e correspondiam a 250 e 500 μL , respectivamente.
5. Vedávamos os tubos com uma fina película de plástico.
6. Submetíamos os tubos de ensaio à agitação no vórtex (Figura 8). Cada tubo era agitado durante um breve intervalo de tempo, correspondente a cerca de 1 s.
7. Ao término da agitação, removíamos completamente a vedação que cobria os tubos.

8. Colocávamos esferas maciças de vidro na abertura dos tubos de cada série (Figura 9).
9. Mergulhávamos os tubos de ensaio parcialmente na água contida dentro do banho de imersão termostatizado a 25 °C, juntamente com um béquer contendo água pura (Figura 10), durante 30 min.
10. Removíamos a esfera de vidro que cobria o tubo 1.
11. Retirávamos esse tubo do banho de imersão termostatizado e então obtínhamos uma alíquota de 25 μ L do sobrenadante da solução contida nesse tubo.
12. Transferíamos a alíquota para a unidade de leitura do refratômetro para a obtenção do seu índice de refração. Para que essas leituras fossem feitas, era preciso acender uma lâmpada para que uma parte da luz fosse captada pelo refratômetro (Figura 11).
13. Lavávamos a unidade de análise do refratômetro com a utilização da água contida no béquer que foi colocado dentro do banho de imersão termostatizado. Em seguida, enxugávamos-na com papel absorvente macio. As etapas de 10 a 13 eram repetidas para os demais tubos.

2.5. Local

Realizamos todos os nossos experimentos no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

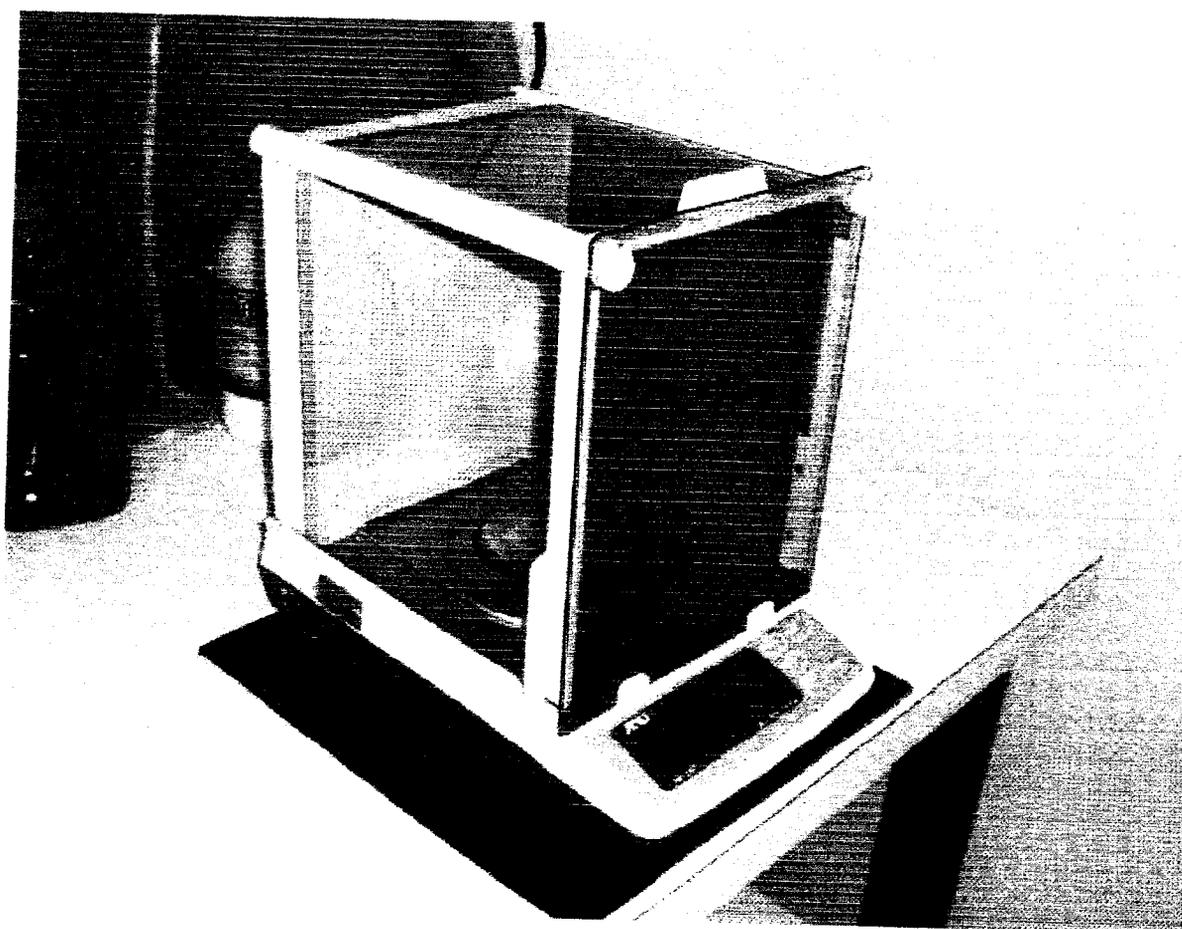


Figura 1: Balança analítica AND, modelo H-R 20.

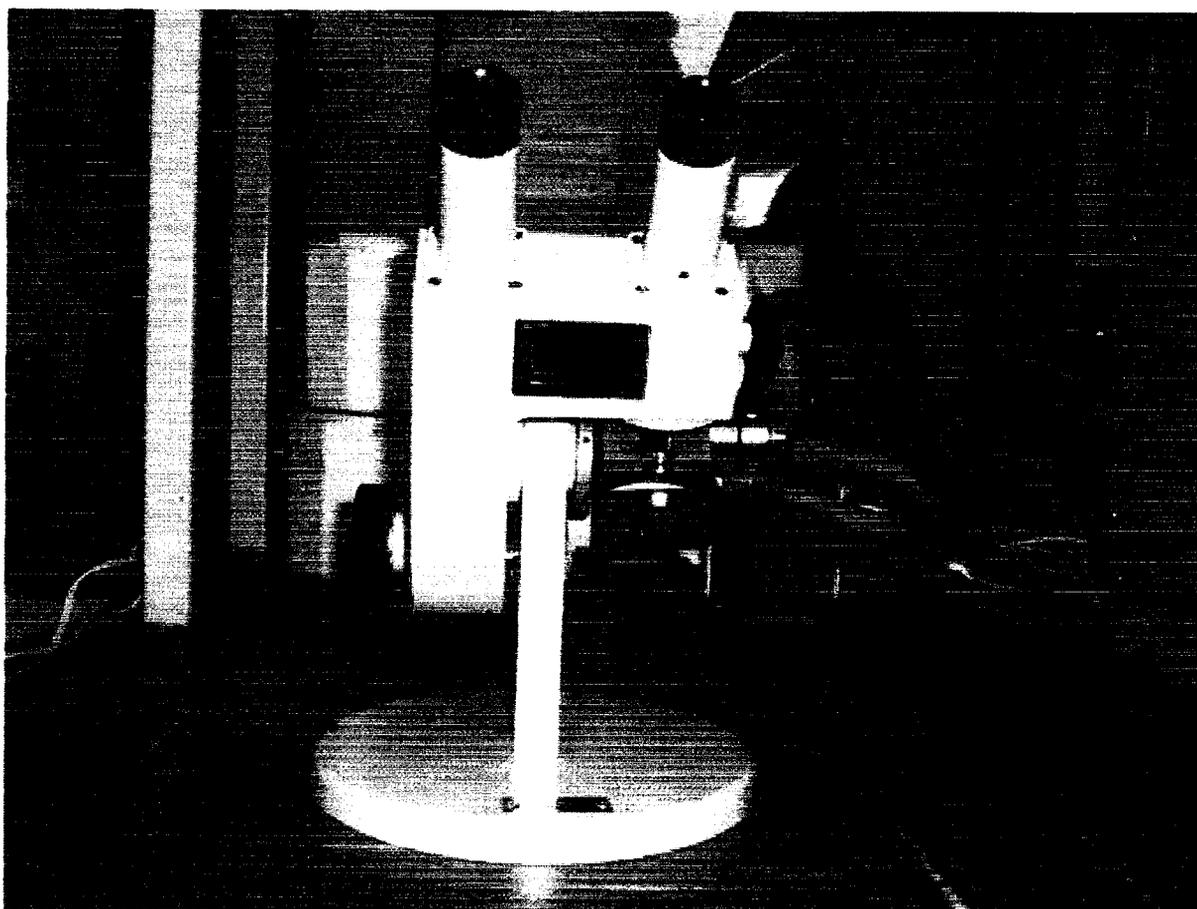


Figura 2: Refratômetro Abbe Refractometer da marca Analytik Jena AG conectado ao banho termostaticado por meio dos tubos preto e laranja, à direita.

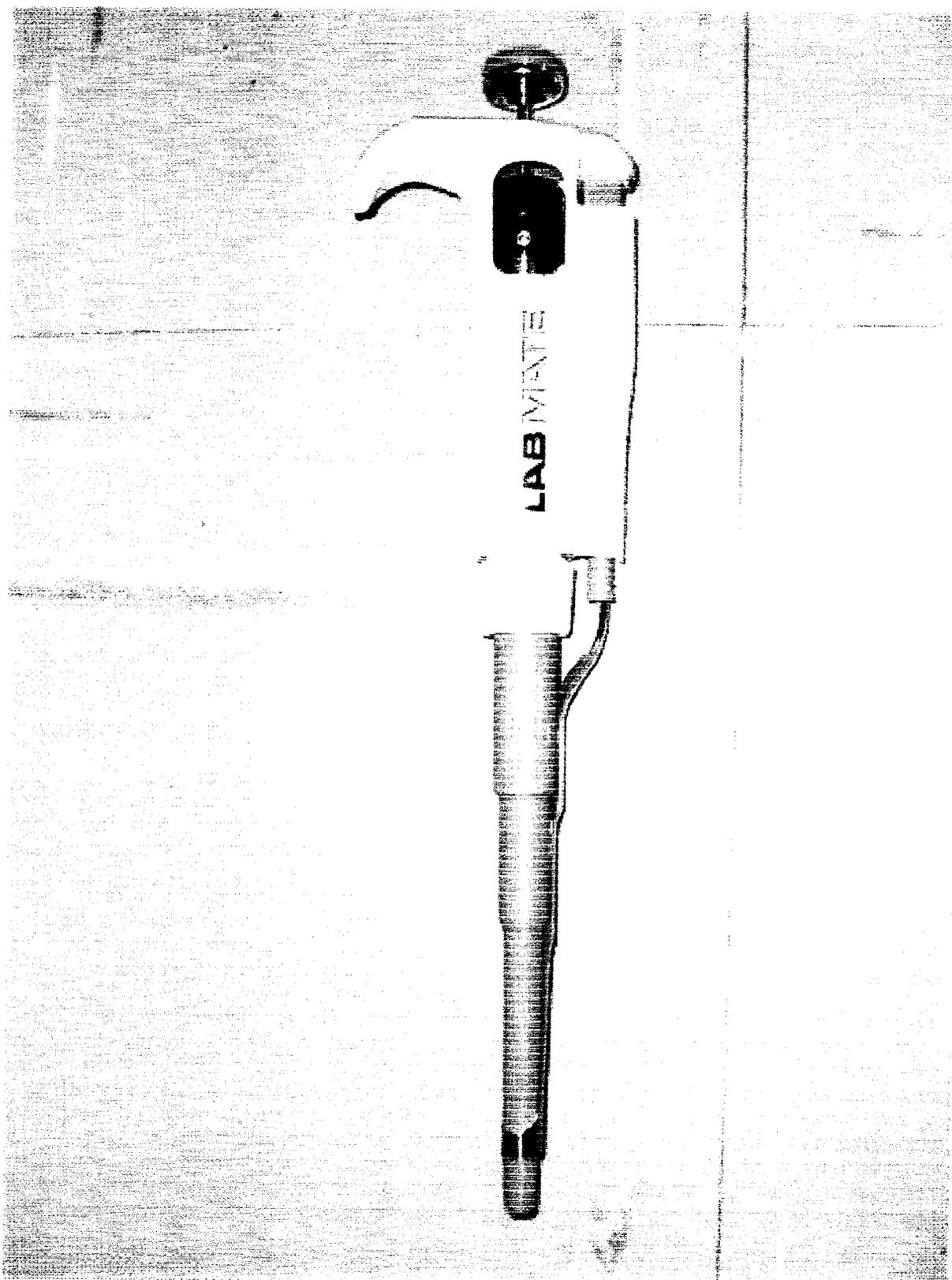


Figura 3: pipeta automática regulável (Modelo Labmate da HTC).

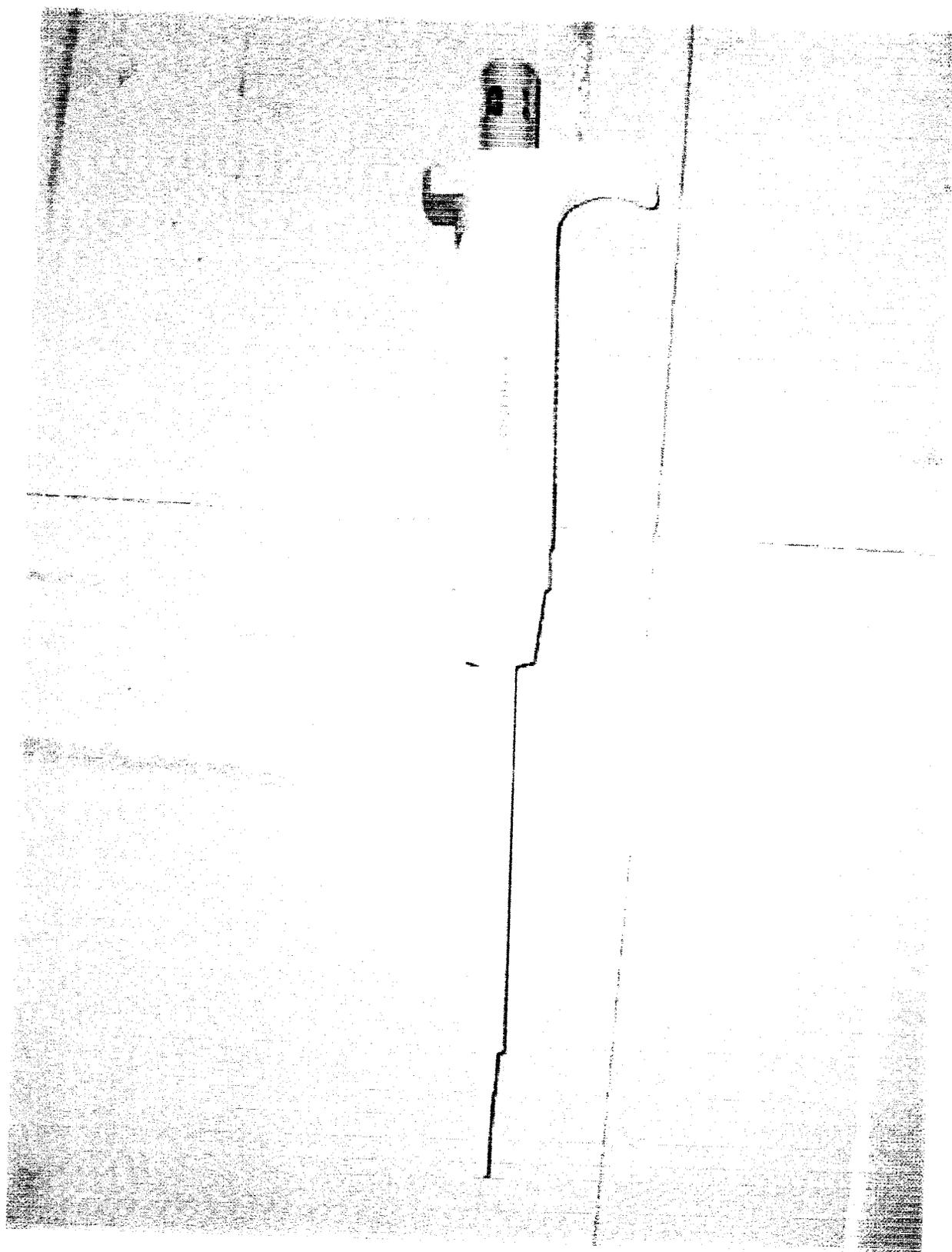


Figura 4: pipeta automática de 25 µL (Socorex).

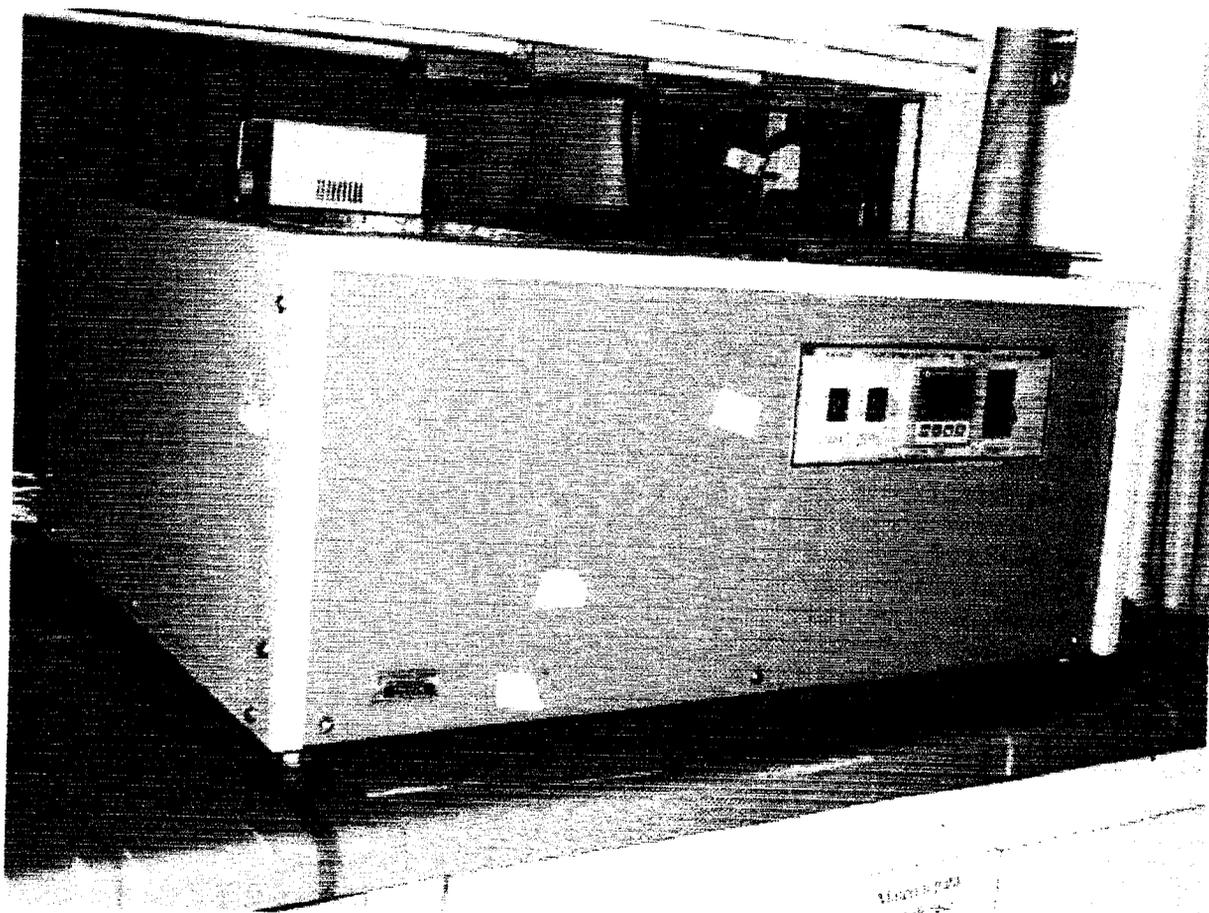


Figura 5: Banho de imersão termostatizado com refrigeração (Marconi).

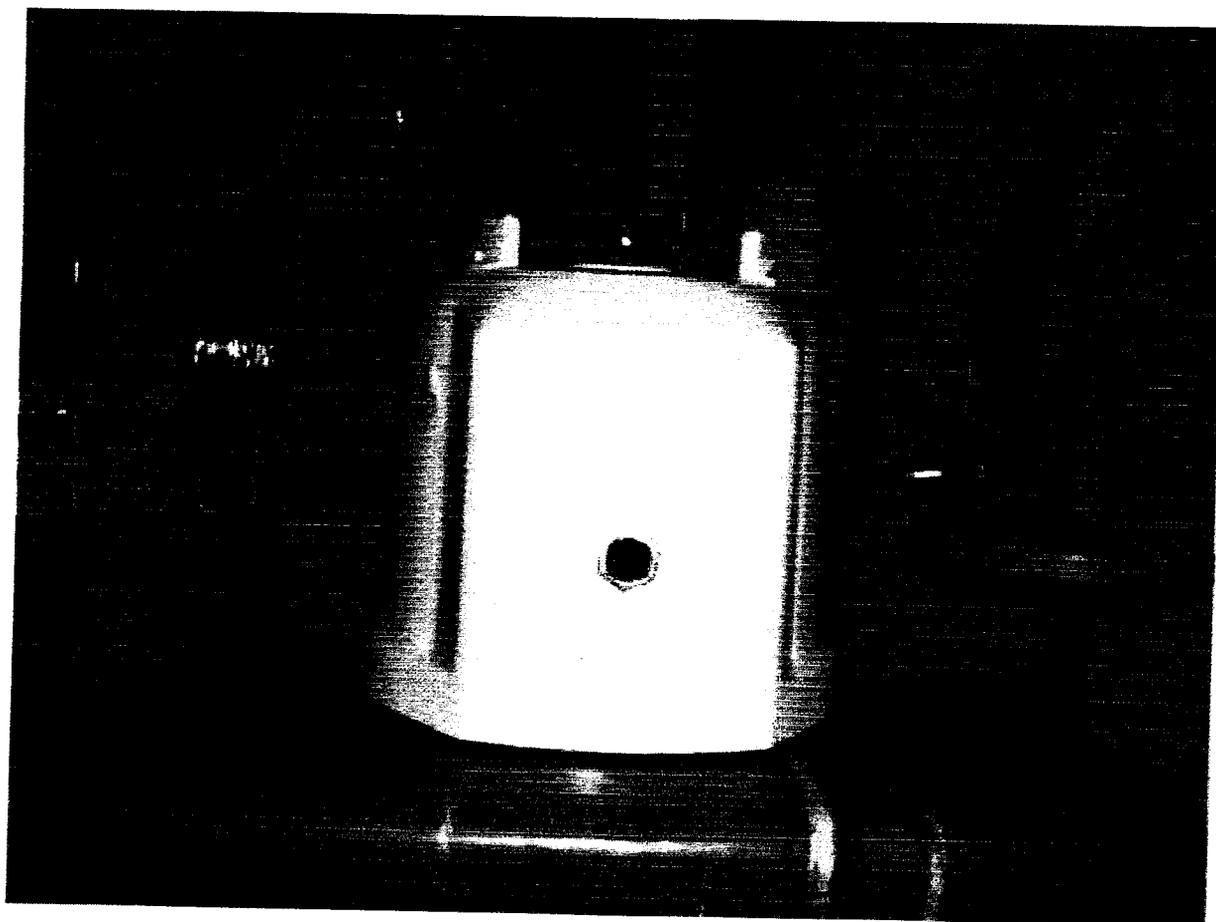


Figura 6: Vórtex construído a partir da base de um liquidificador.



Figura 7: Mario da Silva Garrote Filho e Lúbia Cristina Fonseca ao lado do vórtex que eles construíram



Figura 8: Agitação dos tubos de ensaio no vórtex.

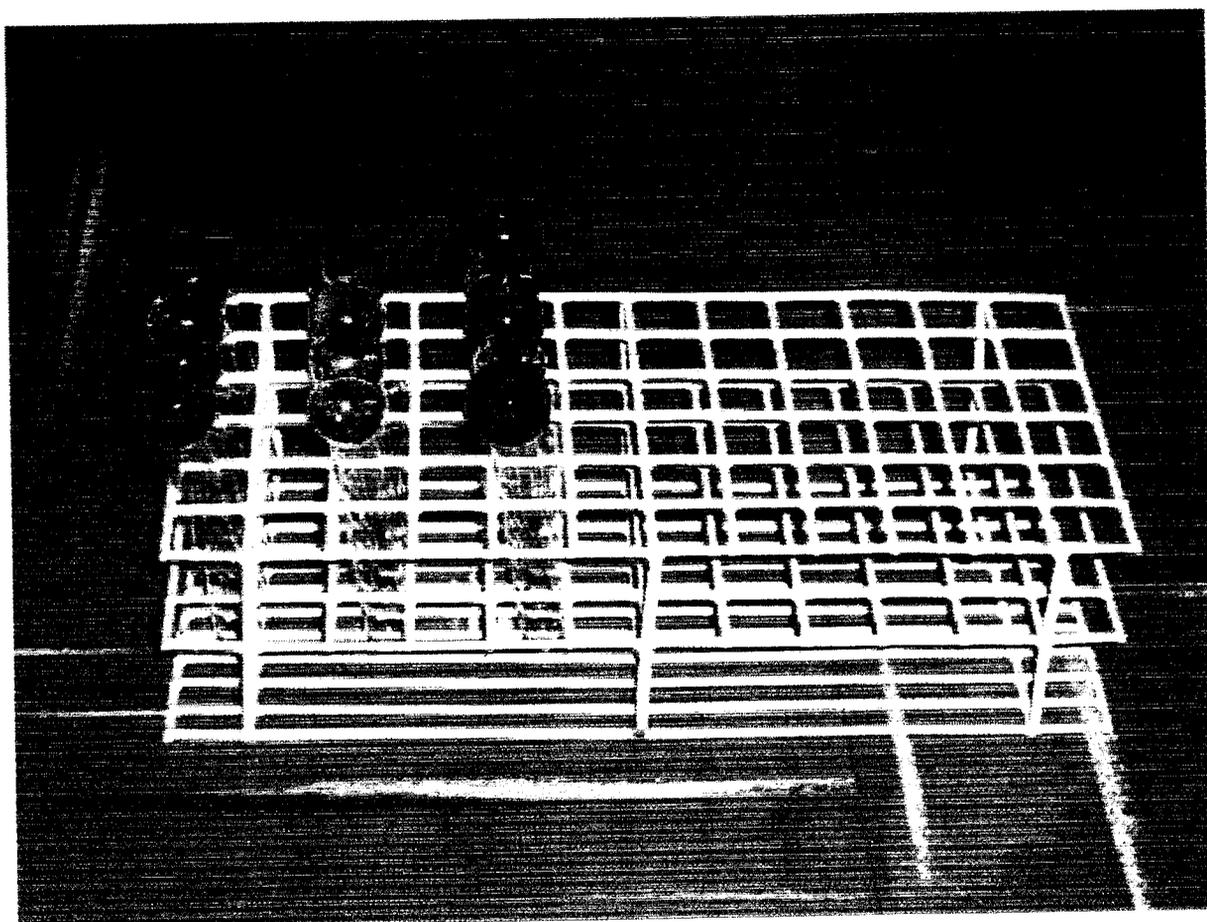


Figura 9: Série de 15 tubos de ensaio cobertos com esferas maciças de vidro.

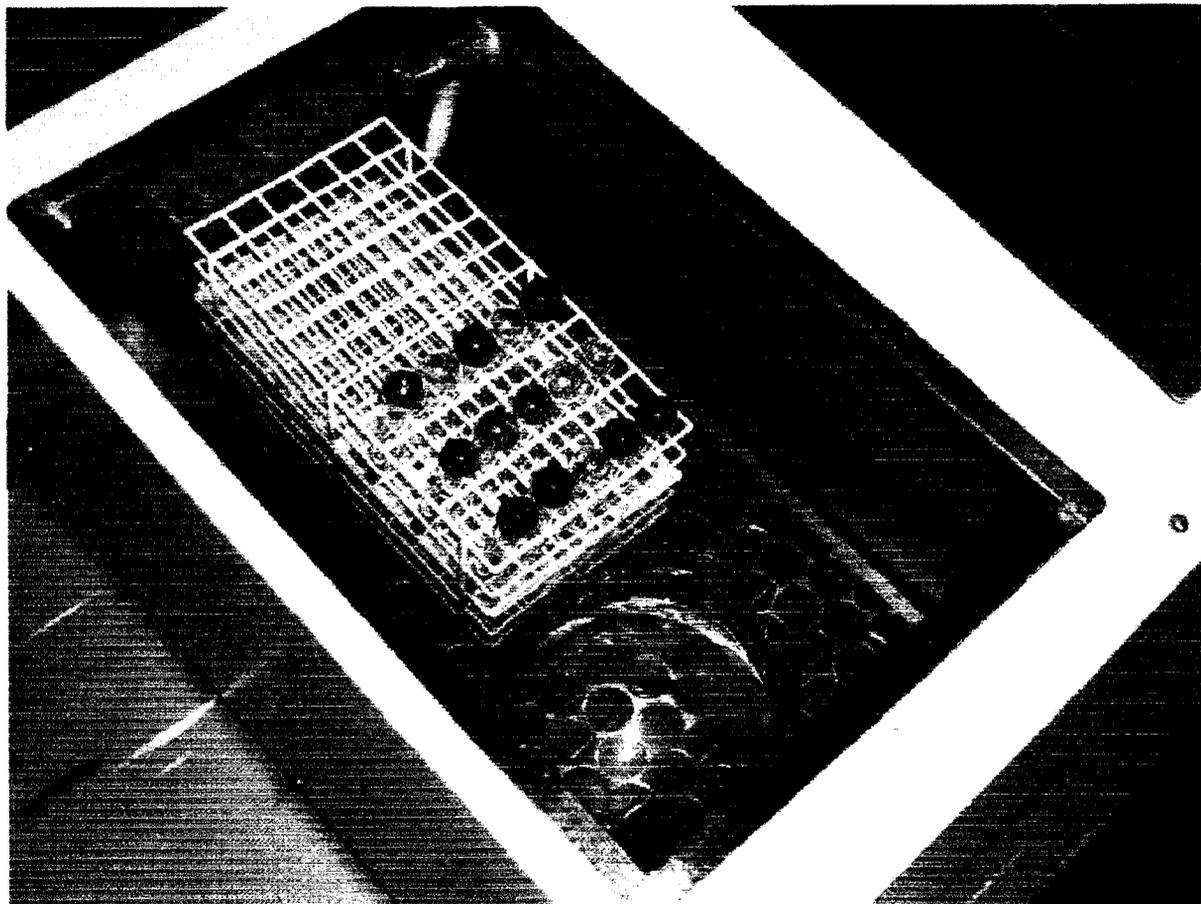


Figura 10: Tubos mergulhados no banho termostático ao lado de um béquer com água. A água desse béquer era usada para lavar a parte do refratômetro em que eram colocadas as alíquotas de sobrenadante para determinação do índice de refração.



Figura 11: Luz acesa para a utilização do refratômetro

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Escolha dos reagentes

Inicialmente havíamos decidido que iríamos realizar experimentos com aminoácidos hidrofóbicos e por isso tínhamos escolhido a tirosina. Planejamos que iríamos realizar as medidas das concentrações das soluções de tirosina em água e em solução de glicerol mediante utilização de espectrofotômetro de luz ultravioleta. No entanto, não foi possível utilizar esse equipamento. Havíamos tentado obter essas medidas por meio do índice de refração (η) do sobrenadante das soluções contendo esse aminoácido. Infelizmente, a solubilidade da tirosina não era grande o suficiente para que pudéssemos identificar alterações de concentração com o uso do refratômetro.

Bolen e colaboradores relatam problemas similares ao estudarem a tirosina, que devido à sua baixa solubilidade, não pôde ser avaliada por métodos densimetria. Por causa disso, eles utilizaram métodos espectrais para obter os valores do limite de solubilidade desse aminoácido (WANG; BOLEN, 1997; QU; BOLEN; BOLEN, 1998). A solubilidade da tirosina é tão pequena que, em 25 °C, uma solução contendo esse aminoácido torna-se saturada quando a concentração desse soluto atinge um valor de cerca de apenas 0,046 g em 100 g de água (NOZAKI; TANFORD, 1963; LIU; BOLEN, 1995; QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

Constatamos que deveríamos utilizar um aminoácido cuja solução se saturasse em concentrações mais elevadas de soluto. Por isso optamos pela arginina (ArgHCL), que de acordo com experimentos conduzidos por Bolen e colaboradores, apresenta solubilidade máxima correspondente a 85,3 g em 100 g de água 25 °C. Esses mesmos autores também determinaram o limite de solubilidade da glicina nessas mesmas condições e obtiveram o valor de 25,1 g em 100 g de água. (NOZAKI; TANFORD, 1963; LIU; BOLEN, 1995; QU; BOLEN; BOLEN, 1998). Pudemos utilizar esses dois aminoácidos com êxito em nossos experimentos.

3.2. Construção do vórtex

Construímos o vórtex a partir de um liquidificador e de uma tampa de borracha usada para vedar pequenos frascos de vidro. Incorporamos essa tampa na parte do liquidificador que

se encaixava com um copo de plástico (Figura 12). Fizemos isso para amortecer o contato dos tubos de ensaio com o liquidificador, pois esses tubos eram feitos de vidro e poderiam se quebrar caso fossem postos diretamente em contato com a parte rotativa do liquidificador. O encaixe da tampa de borracha foi possível porque as hélices de metal estavam contidas no copo e não no corpo do liquidificador.

O motor desse liquidificador foi fabricado para funcionar na voltagem de 220V. No entanto, ao ser ligado a essa tensão elétrica, a rotação gerada era tão intensa que era praticamente impossível manter o tubo em contato com a borracha conectada ao liquidificador, mesmo quando era selecionada a intensidade mínima para o funcionamento do liquidificador. Para contornar esse problema, adotamos um procedimento bastante simples, que consistiu em ligar o motor do liquidificador à voltagem de 110 V, pois isso fazia com que a potência do aparelho fosse suficientemente reduzida para que pudéssemos utilizá-lo na agitação dos tubos.

Havia alguns inconvenientes decorrentes da utilização desse aparelho, como o fato de que a borracha se desgastava com facilidade devido ao atrito com os tubos de ensaio e por isso precisava ser substituída com frequência. Além disso, o aparelho fazia muito barulho quando colocado estava ligado. Mesmo assim, era preferível utilizar o aparelho do que agitar os tubos manualmente, tal como fazíamos antes, quando ainda estávamos estabelecendo os protocolos experimentais.

A agitação manual dos tubos era um procedimento rudimentar e apresentava várias desvantagens que teriam comprometido o andamento das pesquisas caso tivesse sido usado. Esse procedimento era demorado e pouco eficiente. Se não agitássemos os tubos que continham arginina ou glicina imediatamente após a adição de água ou solução de glicerol, esses aminoácidos endureciam, fazendo com que esse processo fosse demorado e pouco eficiente. Muitas vezes, havíamos precisado utilizar um bastão fino de vidro na tentativa de quebrar essa massa endurecida de aminoácidos e, desse modo, torná-la solúvel. Gastávamos mais de 10 minutos ou mais para homogeneizar as soluções de aminoácidos de uma série. A partir do uso do desse vórtex, esse tempo foi reduzido para menos de 2 minutos.

Tudo começou quando, em uma das demoradas sessões de agitação de tubos feita manualmente, a Lúbia comentou comigo sobre a existência de um aparelho, denominado vórtex, que era capaz de agitar tubos de ensaio com muito mais rapidez e eficiência. Era uma pena que o Laboratório de Enzimologia não dispusesse de um equipamento desses, tal como acontecia em outros laboratórios do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU. Cansados e frustrados de agitar tubos de ensaio com a mão, eu e a Lúbia fomos a um dos laboratórios que

possuía um vórtex e, em questão de segundos, homogeneizamos as soluções de aminoácidos dos tubos de uma série completa. Parecia mágica.

Até então eu não conhecia um vórtex. Antes de me deparar com esse equipamento, eu o imaginava a partir das descrições feitas pela Lúbia e pensava que se tratava de um aparelho muito mais complexo do que realmente era. Ao vê-lo pela primeira vez, percebi o quanto o seu funcionamento, e até a sua aparência, era semelhante à de um liquidificador. Comentei isso com a Lúbia e juntos fomos transformando um liquidificador que havia no Laboratório de Enzimologia em um vórtex, conforme foi descrito anteriormente.

3.3. Considerações acerca da realização dos experimentos

3.3.1. Quantidade de tubos de ensaio utilizados em cada série

Os primeiros experimentos que havíamos realizado durante o aprimoramento da técnica envolviam apenas 10 tubos de ensaio e os intervalos de massa utilizados no preparo de soluções de arginina e glicina eram os mesmos, ou seja, 0,05 e 0,02 g, respectivamente. Com a utilização dessa quantidade de tubos, constatamos que o limite de solubilidade não poderia ser obtido com segurança. Então, decidimos acrescentar permanentemente mais 5 tubos de ensaio às séries experimentais do que recalcular o intervalo de massa. Esse procedimento, além de estender a amplitude da massa utilizada em cada série, permitiu que a variação do índice de refração em decorrência do aumento da concentração da solução de aminoácido de um tubo para outro pudesse ser monitorada mais detalhadamente.

3.3.2. Intervalo de massa e da quantidade de tubos de cada série

Determinados os intervalos de massa que utilizamos na pesagem de arginina ou glicina a partir de cálculos efetuados a partir dos limites de solubilidade disponíveis na literatura para cada um desses aminoácidos em água pura a 25 °C (NOZAKI; TANFORD, 1963; LIU; BOLEN, 1995; WANG; BOLEN, 1997).

3.3.3. Volume de solvente utilizado para o preparo das soluções de aminoácido

Utilizamos um volume menor de solvente para a arginina devido ao elevado limite de solubilidade desse aminoácido. Para a realização dos experimentos envolvendo uma série com arginina eram gastos pelo menos 5,25 g, enquanto que para a glicina esse valor era de apenas 2,1 g. Além disso, dispúnhamos de glicina em nosso laboratório, mas não de arginina. Infelizmente, como não contamos com nenhuma bolsa de iniciação científica usualmente oferecida por instituições de apoio à pesquisa, precisamos adquirir por conta própria a maior parte da arginina que utilizamos em nossos experimentos. Assim, o volume reduzido de solvente adicionado às séries com arginina foi uma medida para redução de custos.

3.3.4. Incubação do solvente no banho de imersão termostaticado

Incubávamos a água pura e a solução de glicerol em banho termostaticado a 25 °C para evitar que o volume água variasse em decorrência da alteração da temperatura do ambiente. Por exemplo, suponhamos que, em um determinado dia, a temperatura no interior do Laboratório de Enzimologia fosse igual a 20 °C e que então pipetássemos 500 µL de água de um recipiente, que também estaria a 20 °C devido ao equilíbrio térmico com o ambiente. Por apresentar maior densidade, essa amostra conteria mais moléculas de água do que aquela presente em um volume idêntico, porém a 25 °C. Isso aconteceria porque a densidade da água líquida diminui com o aumento da temperatura, devido ao efeito decorrente da dilatação térmica.

3.3.5. Tempo de agitação dos tubos de ensaio

A duração da agitação dos tubos de ensaio de cada série era de apenas 1 s porque o contato prolongado com o vórtex provocava o aquecimento do tubo e conseqüentemente da solução nele contida. Essa variável poderia interferir nos resultados a serem obtidos e por isso a eliminamos, ou pelo menos a minimizamos, com a padronização do tempo de agitação reduzido.

3.3.6. Vedação dos tubos de ensaio

Vedávamos os tubos com uma película de plástico antes de agitá-los para evitarmos a contaminação ou o vazamento da solução contida nesses tubos. Após a padronização da técnica, não houve casos em que as soluções de um ou mais tubos não tivessem sido suficientemente homogeneizadas. No entanto, se isso eventualmente tivesse acontecido, o procedimento de agitação teria sido repetido para todos os tubos da série.

3.3.7. Colocação de esferas de vidro

Colocávamos esferas maciças de vidro na abertura de cada um dos tubos na tentativa de evitar a evaporação da água da solução contida nos tubos, pois se isso acontecesse, poderia haver em um aumento da concentração dessa solução, o que se refletiria nos valores dos índices de refração medidos, que não seriam aqueles da solução que havíamos inicialmente preparado.

3.3.8. Controle da temperatura

Resolvemos o problema da temperatura do refratômetro conectando-o ao banho termostaticado por meio de tubos (Figura 2). Esses tubos permitiam a circulação de água entre o banho de imersão termostaticado e o refratômetro. No entanto, a temperatura da água que ia do banho de imersão termostaticado para o refratômetro variava de acordo com a temperatura no interior do laboratório. Por exemplo, se a temperatura do ambiente fosse de 20 °C, haveria uma perda de calor da água para o ambiente, de modo que a água que chegava ao refratômetro teria temperatura inferior a 25 °C. Para compensar isso, fazíamos ajustes no controle de temperatura do banho de imersão termostaticado (Figura 13) para que a água contida nesse equipamento fosse elevada de tal modo a compensar a perda de calor para o ambiente e assim manter o refratômetro a 25 °C.

O ideal seria que tivéssemos utilizado um banho de imersão termostaticado para o controle da temperatura do refratômetro e outro para o controle da temperatura dos tubos de ensaio nos quais estavam contidas as soluções de aminoácido. No entanto, no laboratório havia apenas um único banho de imersão termostaticado que estava em boas condições de uso. Por isso, um único banho de imersão termostaticado foi usado tanto para o controle da

temperatura dos tubos como para o controle da temperatura do refratômetro. Devido à transferência de calor entre a água do banho de imersão termostatizado e o ambiente que rodeava os canos em que esse líquido circulava, não era possível manter a série de ensaio e o refratômetro simultaneamente a 25 °C. Somente um desses dois poderia ser mantido a essa temperatura. Decidimos que o refratômetro teria essa prerrogativa, em detrimento da série de tubos de ensaio.

A temperatura do ambiente não costumava se diferir muito de 25 °C, de modo que a diferença de temperatura entre o refratômetro e o banho de imersão termostatizado era pequena. Isso minimizava a possibilidade de ocorrência de erros experimentais devido a esse fator.

Depois que mergulhávamos os tubos na água do banho de imersão termostatizado, ajustávamos novamente a temperatura desse equipamento para que a unidade de leitura do refratômetro fosse mantida a 25 °C. Esse ajuste não era muito simples, pois o fato de o ambiente estar a 20 °C, por exemplo, não significava que o banho de imersão termostatizado deveria ser programado com a temperatura de 30 °C, o que aparentemente compensaria a perda de calor decorrente da diferença de 5 °C entre a temperatura do ambiente e aquela que o refratômetro deveria apresentar.

Fazíamos o ajuste da temperatura do banho de imersão termostatizado na base da suposição, pois não havíamos elaborado testes para a determinação de uma equação que nos permitisse obter a temperatura com a qual o banho de imersão termostatizado deveria ser programado a partir de uma determinada temperatura ambiente. Por isso, depois que incubávamos os tubos no banho de imersão termostatizado, ajustávamos continuamente a temperatura desse equipamento até que o refratômetro exibisse a temperatura de 25 °C.

3.3.9. Duração da incubação dos tubos de ensaio

Deixávamos os tubos mergulhados em banho termostatizado por 30 minutos. Esse tempo era necessário para que a solução dentro dos tubos entrasse em equilíbrio térmico com a água aquecida do banho de imersão termostatizado e também para que o soluto em excesso se precipitasse.

3.3.10. Encaixe das esferas de vidro

O tamanho e o formato das esferas de vidro permitia que se encaixassem bem na abertura dos tubos usados no experimento, o que era também favorecido pelo fato de que o diâmetro dos tubos e das esferas de vidro era praticamente constante. Por isso, podíamos remover as esferas de vidro com facilidade, de modo que a perturbação causada na solução contida nos tubos era mínima.

Além disso, obtínhamos as amostras de 25 μL tomando-se o maior cuidado possível para que não agitássemos os tubos acidentalmente, pois isso poderia interferir no equilíbrio químico entre o sobrenadante e o precipitado no momento em que retirávamos a alíquota, comprometendo o experimento.

3.3.11. Leitura do índice de refração

Como o refratômetro é de metal, que é um bom condutor térmico, estimamos que o tempo requerido para que essa alíquota entrasse em equilíbrio térmico com o refratômetro seria pequeno e por isso na obtenção das leituras dos índices de refração eram realizadas assim que as alíquotas eram colocadas na unidade de análise desse equipamento.

3.4. Construção dos gráficos

Utilizávamos o programa Origin 6.0 para a construção de gráficos que representavam a variação do índice de refração das alíquotas conforme a concentração teórica da solução de arginina ou de glicina em cada tubo, tanto nas séries em que o solvente era apenas água como naquelas em que foi adicionada solução de glicerol. Nesses gráficos, plotávamos os valores calculados para a concentração das soluções de aminoácido no eixo das abscissas, enquanto que no eixo das ordenadas incluíamos os valores da variação do índice de refração (Δn) correspondentes às concentrações do sobrenadante das soluções de aminoácidos dos tubos de que foram extraídas.

Calculávamos a variação do índice de refração subtraindo-se o valor do índice de refração do tubo branco daqueles encontrados em outros tubos. O objetivo disso era eliminar a contribuição da água ou da solução de glicerol nos valores do índice de refração medido para as alíquotas.

Construímos gráficos usando tanto os valores do índice de refração que havíamos lido no refratômetro como aqueles resultantes do cálculo da variação do índice de refração. O valor do limite de solubilidade obtido em cada um desses gráficos era praticamente o mesmo. Ainda assim, preferimos usar os valores de Δn na construção de todos os gráficos, para que ficasse implícito que a alteração dos índices de refração registradas no gráfico eram decorrentes da alteração da massa de arginina ou glicina.

Na Figura 14 é mostrado um gráfico referente a um dos experimentos que havíamos realizado. Nesse experimento havíamos adicionado uma solução de glicerol $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ previamente incubada a 25°C aos tubos de uma série com glicina. Pode-se perceber que os valores do índice de refração das alíquotas inicialmente aumentam concomitantemente à elevação da concentração da solução de aminoácido e depois aparentemente tornam-se constantes. Um padrão similar a esse se repetiu nos gráficos construídos para todos os demais experimentos realizados.

Visualmente, na Figura 14, a concentração de 25 g.dL^{-1} parece delimitar dois conjuntos de dados, de acordo com o comportamento dos pontos indicados no gráfico dessa figura. No primeiro conjunto, os valores do índice de refração das alíquotas aumentam à medida que a concentração das soluções de aminoácido torna-se gradativamente maior. Isso acontece desde o tubo em que não há nenhuma massa de glicina até aquele em que a concentração da solução desse aminoácido alcança valores próximos a 25 g.dL^{-1} . Já no segundo conjunto, os valores dos índices de refração tendem a permanecer constante, não obstante o aumento da concentração teórica das soluções de glicina.

3.5. Obtenção do limite de solubilidade

O limite de solubilidade de uma solução corresponde à concentração máxima de soluto que um solvente é capaz de dissolver. A massa de soluto excedente se precipita no fundo do recipiente formando o precipitado ou corpo de fundo e a solução passa então a ser formada por duas fases. Uma dessas fases é composta pelos aminoácidos dissolvidos no solvente, enquanto que a outra é formada pelos aminoácidos que se precipitaram. Os aminoácidos dessas duas fases estão em equilíbrio.

Realizávamos a determinação do limite de solubilidade graficamente pela interseção de uma reta de regressão linear que obtínhamos a partir do primeiro conjunto de dados com a

reta que corresponde ao valor do termo A_2 de uma sigmóide, que traçávamos selecionando-se todos os pontos do gráfico. No entanto, esse termo se refere apenas ao segundo conjunto de dados e por isso resulta em uma reta que é aproximadamente paralela ao eixo das abscissas.

No primeiro conjunto de dados, há vários pontos que poderíamos ter escolhido para a determinação de uma reta. Inicialmente, havíamos tentado selecionar todos os pontos, mas a reta resultante não se enquadrava bem a esses pontos. Seria necessário escolher apenas alguns pontos desse conjunto. Para isso, traçávamos várias retas de regressão linear. A primeira dessas retas era obtida a partir dos dois primeiros pontos. A segunda reta, por sua vez, resultava dos três primeiros pontos, e assim por diante. Ao todo, encontrávamos 14 retas, que denominamos de retas de regressão linear secundárias (Figura 15).

As várias retas mostradas no gráfico da Figura 15 interceptam-se e parecem convergir para uma determinada região do gráfico situada no primeiro conjunto de dados. Há três pontos contidos nessa região, sendo eles o segundo, o terceiro e o quarto. Selecionávamos esses pontos e os usávamos para traçar uma nova reta de regressão linear, que chamamos de reta de regressão linear principal ou simplesmente de reta principal. (Figura 16). Essa reta representa graficamente o que aconteceria se a capacidade do solvente em dissolver a glicina ou a arginina fosse infinita. O critério para a seleção dos pontos que usamos na obtenção dessa reta foi o mesmo em todos os outros gráficos.

A partir dos valores de A e B da reta de regressão linear principal ($Bx + A = y$) e do valor de A_2 da sigmóide, elaboramos uma equação (Equação 2) que nos permitia calcular o valor do limite de solubilidade (S). Nessa equação, substituímos os valores de x e de y da reta de regressão linear por S e A_2 , respectivamente. Isolando o termo S , obtivemos a equação mostrada a seguir:

$$S = \frac{A_2 - A}{B} \quad (2).$$

3.6. Cálculo da massa do precipitado

Em uma solução, a massa total de um soluto (m_t) pode estar totalmente ou parcialmente dissolvida (m_d). No segundo caso, a massa do soluto que não foi dissolvida acumula-se no fundo do recipiente, formando o precipitado (m_p). Assim, pode ser estabelecida a seguinte relação:

$$m_t = m_d + m_p \quad (3)$$

Nos experimentos que realizamos, o soluto era arginina ou glicina e a massa total de cada um desses aminoácidos era aquela que foi pesada e então colocada aos tubos. Após a adição de água pura ou de solução de glicerol, essa massa poderia ter sido completamente ou parcialmente dissolvida. Apesar das concentrações indicadas no eixo das abscissas corresponderem à massa total, as alíquotas a partir das quais foram medidos os índices de refração continham apenas a parcela da massa dissolvida.

Construímos gráficos em que os valores do eixo das abscissas correspondiam às massas colocadas nos tubos, enquanto que o eixo das ordenadas apresentava uma escala com os valores dos índices de refração das soluções de aminoácido de cada tubo. A partir de gráficos como esses, foi possível que calculássemos a massa do precipitado formado. Pudemos realizar esse cálculo tanto para a arginina como para a glicina, quer em água ou em solução de glicerol.

O primeiro passo para o cálculo da massa do precipitado consistia em obtermos a reta de regressão linear principal. Depois disso, encontrávamos a média dos valores de A e de B dessas retas para cada um dos experimentos realizados. Então, a partir da média dos valores de A (A_m) e de B (B_m), obtinhamos uma nova reta de regressão linear, conforme mostrado a seguir:

$$\eta_m = B_m m_d + A_m \quad (4).$$

Como o cálculo da massa de precipitado não era o objetivo central da pesquisa que desenvolvemos para a elaboração do presente trabalho, realizamos cálculos apenas para a mistura de arginina em água pura. A reta de regressão linear para o cálculo da massa dissolvida, nesse caso, foi:

$$\eta_m = 0,44667 m_d + 1,3465 \quad (5).$$

Tanto na Equação 4 como na Equação 5, η_m corresponde a média dos valores do índice de refração das alíquotas dos tubos cuja massa de arginina dissolvida desejávamos calcular. Esse procedimento poderia ter sido aplicado para quaisquer outros tubos, mas por

praticidade escolhemos apenas aqueles cuja concentração das alíquotas obtidas do sobrenadante possuíam índice de refração situado na curva de transição entre a reta que representa os aminoácidos dissolvidos e aquele que se refere aos aminoácidos precipitados. Esses tubos foram aqueles que havíamos enumerado como 6, 7 e 8 e que possuíam massa correspondente a 0,25, 0,30 e 0,35 g. Para a exemplificação do método consideramos apenas o tubo 7.

Como realizávamos três séries de experimentos para encontrar o limite de solubilidade da arginina em água pura, isso significava que havia três tubos que continham uma massa de 0,30 g. Encontramos que a média dos valores do índice de refração constatado para as alíquotas retiradas desses tubos foi igual a 1,4400. Ao inserirmos esse valor na Equação 5, encontramos que a massa dissolvida de arginina era de 0,205 g. E como a massa total era de 0,30 g, isso significa que, de acordo com a Equação 3, a massa do precipitado era de 0,091 g.

Fizemos experimentos com gravimetria para a confirmação da massa de precipitado calculada. Essa técnica consistiu em pesar o soluto após remoção do solvente. Para a realização das análises gravimétricas, primeiramente removemos a solução de aminoácido dos tubos usados nos experimentos, de modo que restasse apenas o precipitado hidratado. Em seguida, incubamos os tubos em uma estufa a 103 °C durante 24 horas, para a remoção da água do precipitado. Posteriormente, pesamos novamente esses tubos e o valor obtido foi subtraído daquele correspondente ao peso do tubo, que havíamos obtido previamente. Realizamos três análises gravimétricas para tubos com massa de arginina de 0,30 g. Nessas análises encontramos os seguintes valores de massa para o precipitado: 0,1183 g, 0,1024 g e 0,1023 g. Mediante a realização do teste t de Student, constatamos que a massa teórica do precipitado não diferia daquela encontrada experimentalmente mediante o uso de gravimetria.

3.7. Cálculo da energia livre de transferência

Quando o limite de solubilidade é alcançado, os aminoácidos na fase de precipitado e de sobrenadante ficam em equilíbrio químico, o que significa que o potencial químico dessas fases é o mesmo. Isso é válido para qualquer solvente, pois o potencial químico da fase de precipitado é invariável (NOZAKI & TANFORD, 1963; LIU; BOLEN, 1995; QU, BOLEN; BOLEN, 1998). Disso pode ser inferida uma reação de equilíbrio envolvendo a passagem do aminoácido de um solvente para outro. No nosso caso, essa passagem envolveria a arginina e a glicina e ocorreria espontaneamente da solução de glicerol para a água pura, pois tal

transferência envolveria diminuição do potencial químico desses aminoácidos. No entanto, para os cálculos de energia livre, considereamos a situação na qual se tinha a transferência desses aminoácidos da água pura para solução de glicerol. Nessa reação, o aminoácido em água pura seria o produto, enquanto que aquele em solução de glicerol seria o reagente.

As constantes termodinâmicas que envolvem reações de equilíbrio consistem no quociente da concentração do produto pela concentração do reagente. Assim, a partir da reação de equilíbrio entre o aminoácido solubilizado e o aminoácido precipitado, podemos obter uma constante de equilíbrio em termos de solubilidade, K_s , que corresponde quociente entre o limite de solubilidade da glicina ou arginina em água pura (N_w) pelo limite de solubilidade desses mesmos aminoácidos em solução de glicerol (N_{os}), conforme mostrado na Equação 6:

$$K_s = \frac{S_{os}}{S_w} \quad (6).$$

Determinamos a variação de energia livre decorrente da transferência de glicina ou arginina da água pura para solução de glicerol de acordo com a equação apresentada a seguir (TANFORD, 1962; LIU; BOLEN, 1995; WANG; BOLEN, 1997):

$$\Delta G^\circ_t = -RT \ln K_s \quad (7),$$

onde ΔG°_t , representa a variação do potencial químico padrão resultante da transferência da arginina ou glicina da água pura para cada solução de glicerol, R é a constante universal dos gases (1,987 cal/K.mol), T é a temperatura absoluta em Kelvin (K) e K_s é a constante de solubilidade. Devido às unidades de cada termo dessa equação, o valor de ΔG°_t é expresso em caloria por mol.

Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas a mesma estrutura básica, que é formada pela ligação de um grupo carboxila e de um grupo amino a um átomo de carbono que é denominado de carbono α , ao qual também está ligado um átomo de hidrogênio. Na glicina, há um outro átomo de hidrogênio ligado na valência restante do carbono α . Nos demais aminoácidos, essa valência é ocupada por uma cadeia lateral (NELSON; COX, 2002). Assim, para obter a variação do potencial químico para a cadeia lateral de um aminoácido ($\delta\Delta G^\circ_t$) efetuamos a diferença entre o valor de ΔG°_t do aminoácido e aquele correspondente a glicina

(TANFORD, 1962; NOZAKI; TANFORD, 1963; LIU; BOLEN, 1995; QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

3.8. Redução do limite de solubilidade

O comportamento da arginina e da glicina na transição da água pura para solução de glicerol foi condizente com estudos realizados por outros pesquisadores (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989). Na Tabela 1, percebe-se que, na presença de glicerol, há uma redução do limite de solubilidade desses dois aminoácidos, o que significa que o glicerol faz com que as soluções contendo cada um desses aminoácidos se tornem saturadas em concentrações menores.

3.9 Explicação para a diminuição do limite de solubilidade

3.9.1. Aumento do grau de hidratação do aminoácido

Esse efeito do glicerol poderia ser explicado pelo fato de que esse osmólito age no sentido de aumentar o grau de hidratação de uma molécula mediante efeito solvofóbico. Assim, na presença de glicerol, a camada de hidratação que se forma ao redor de cada molécula de arginina e de glicina seria mais enriquecida com moléculas de água (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989).

A intensificação da camada de hidratação resulta em um aumento do potencial químico da arginina e da glicina. Desse modo, esses aminoácidos tenderiam a se agregar para diminuir a superfície de contato com o solvente e assim restringir o tamanho da camada de hidratação que é formada ao redor deles (BOLEN, 2004). Esta maior agregação favoreceria a formação de precipitado e ocorreria em concentrações menores do que aquelas que seriam verificadas para a água pura.

3.9.2 Competição do glicerol pelas moléculas de água do solvente

Além disso, para poder permanecer solúvel, o glicerol também precisaria ser hidratado e competiria com a arginina ou com a glicina pelas moléculas de água do solvente. Portanto, isso diminuiria a capacidade do solvente aquoso em dissolver esses aminoácidos. Desse modo, seria esperado que uma solução aquosa de arginina ou glicina se saturasse em concentrações menores na presença de glicerol. Esse efeito tem sido ignorado por outros pesquisadores que tem estudado a ação de osmólitos sobre aminoácidos e proteínas, provavelmente porque não seja significativo.

3.9.3. Disponibilidade de moléculas de água para a solubilização dos aminoácidos

Com o aumento do grau de hidratação do aminoácido e ainda pelo efeito de competição do glicerol, haveria uma redução da quantidade de moléculas de água do solvente disponíveis para solubilizar a arginina ou a glicina, o que aumentaria a precipitação desses aminoácidos.

Além disso, a quantidade de moléculas de água em 250 μL de água pura, por exemplo, é maior em uma solução de glicerol 0,5 mol.L^{-1} com esse mesmo volume, pois parte do volume seria constituído por moléculas de glicerol, enquanto que o restante seria preenchido por moléculas de água. Mas como quantidade de água é muito maior do que a de glicerol, essa diferença é praticamente insignificante.

3.10. Gráficos obtidos

Construímos um gráfico diferente para cada um dos experimentos que realizamos e então obtínhamos os termos A e B da reta de regressão linear principal e o termo A2 da sigmóide de cada gráfico. Para tornar mais prática a exibição desses gráficos, nós reunimos eles em figuras distintas de acordo com o tipo de aminoácido a que se referem. Além disso, cada uma dessas figuras contém dois painéis, A e B, que se referem aos gráficos que descrevem o comportamento do aminoácido em água pura e em solução de glicerol, respectivamente. Assim, na Figura 17 são mostrados os gráficos referentes a arginina e na Figura 18, os gráficos exibidos referem-se a glicina.

3.11. Comparação dos nossos dados com os da literatura científica

Na literatura científica há relatos de obtenção do limite de solubilidade da arginina e da glicina em água pura a 25 °C (NOZAKI; TANFORD, 1963; LIU; BOLEN, 1995; WANG; BOLEN, 1997; QU; BOLEN; BOLEN, 1998). Entretanto, para que pudéssemos comparar nossos dados com aqueles da literatura, tivemos que convertê-los de g de aminoácido por dL de solvente para g de aminoácido por 100 g de água.

Pesamos várias amostras de 0,5 mL de água a 25 °C e obtivemos uma massa média correspondente a 0,50246 g. Assim, pudemos inferir que 100 mL de água possui uma massa de 100,852 g. Mediante o uso de regra de três simples, encontramos que a média dos limites de solubilidade indicados na Tabela 1 para a arginina e para a glicina valem, respectivamente, 85,1 e 22,0 g de aminoácido por 100 g de solvente (Tabela 2).

Os valores descritos na literatura foram de 85,3 e 25,1 g de aminoácido por 100 g de água para a arginina e para a glicina, respectivamente. Desse modo, o erro relativo entre os valores de limite de solubilidade que obtivemos e aqueles descritos pela literatura foi de 0,23 e 12,35 % para a arginina e para a glicina, respectivamente (Tabela 2).

3.12. Fatores que podem ser ter interferido nos resultados que obtivemos

3.12.1. Falha no método de análise dos dados

Poder-se-ia pensar que essa divergência entre os valores que obtivemos por refratometria e aqueles da literatura teria sido provocada por alguma falha no método que desenvolvemos para a análise dos dados. Não acreditamos nisso, pois os valores calculados para a massa de precipitado foram condizentes com aqueles obtidos por gravimetria, conforme mostrado na Tabela 3.

3.12.2. Diferença de temperatura entre o refratômetro e o banho de imersão termostatizado

A discrepância entre os valores de limite de solubilidade apresentada na Tabela 2 pode ter sido decorrente de falhas no procedimento que foi utilizado para a realização dos nossos experimentos. Nesse caso, é possível que a diferença de temperatura entre o banho

termostatizado e o refratômetro tenha interferido nos dados coletados. No entanto, essa diferença de temperatura era pequena (menor do que 3 °C) e mesmo que tenha sido a causa principal da distorção dos dados, a divergência entre os erros para a arginina e para a glicina não teria sido tão grande, já que as soluções formadas por esses dois aminoácidos teriam sido afetadas de modo similar por esse fator.

3.12.3. Profundidade de inserção da pipeta para a obtenção de alíquotas de solução

O procedimento que adotamos foi o mesmo para a arginina e para a glicina, com exceção do volume de solvente que utilizamos para solubilizar cada um desses aminoácidos. Usamos 250 µL e 500 µL para dissolver massas de arginina e glicina, respectivamente. Essa diferença pode ter sido uma fonte de erros significativa, pelo menos indiretamente. Como o diâmetro dos tubos utilizados no experimento era o mesmo, a altura da coluna alcançada pelas soluções de glicina era maior do que aquela verificada para as soluções de arginina.

Para obtermos as alíquotas do sobrenadante inseríamos levemente a ponteira da pipeta no topo da solução, de modo a manter a maior distância possível do precipitado, pois a altura da coluna da solução era tão pequena que não podíamos mergulhar muito a ponteira durante a obtenção dessas alíquotas. Para as soluções de glicina, a ponteira poderia ser introduzida a uma maior profundidade, mas preferimos coletar as alíquotas do sobrenadante da parte mais superficial da solução, tal como fazíamos para a arginina.

Durante a realização dos experimentos, constatamos que havia um gradiente de concentração na solução do sobrenadante, de tal forma que a concentração de aminoácido aumentava do topo da solução em direção ao fundo, onde estava localizado o precipitado. Entretanto, se essa tivesse sido a razão dos erros, seria de se esperar que o limite de solubilidade da glicina correspondesse a uma concentração mais elevada, talvez até mesmo maior do que aquela relatada pela literatura, pois a existência desse gradiente implica que a parte superior do sobrenadante demora mais a se saturar de aminoácido do que aquela situada em maiores profundidades.

3.13. Explicação da divergência entre os erros relativos encontrados para a arginina e para a glicina

3.13.1 Qualidade da glicina

É possível que a maior diferença detectada para o limite de solubilidade da glicina seja decorrente de uma menor qualidade do reagente que utilizamos em nossos experimentos. No entanto, não realizamos testes para verificar a autenticidade do valor de pureza indicado pela fabricante e por isso podemos afirmar com certeza que essa tenha sido a causa — ou uma das causas — da divergência entre os nossos dados e os da literatura.

3.13.2 Tempo de incubação dos tubos

Além disso, é possível que o tempo destinado para a incubação dos tubos no banho termostaticado não tenha sido suficiente para que o equilíbrio entre os aminoácidos dissolvidos e aqueles que se precipitaram fosse devidamente alcançado, de modo que uma parte dos aminoácidos que deveriam formar o precipitado ainda poderia ter estado dissolvida quando foram retiradas alíquotas do sobrenadante das soluções que continham esses aminoácidos.

3.14. **Valores de energia livre obtidos**

O cálculo da energia livre de transferência, realizado pela Equação 7 a partir da média dos valores de limite de solubilidade contidos na Tabela 1, revela que a transferência de arginina e de glicina da água pura para uma solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol é um processo desfavorável, pois envolve aumento de energia livre (Tabela 4). Esse comportamento foi condizente com aquele descrito na literatura (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; LIU; BOLEN, 1995; WANG; BOLEN, 1997; QU; BOLEN; BOLEN, 1998).

Na Tabela 4 também é indicado o valor da energia livre de transferência para a cadeia lateral da arginina. Pode-se perceber que a transferência dessa cadeia lateral da água pura para uma solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol é um processo ligeiramente desfavorável. Esse resultado, entretanto, entra em conflito com o que é descrito na literatura (LIU; BOLEN, 1995; WANG; BOLEN, 1997; QU; BOLEN; BOLEN, 1998). Acreditamos que essa divergência tenha ocorrido devido ao erro relacionado ao limite de solubilidade que obtivemos para a glicina.

Tabela 1: Limite de solubilidade (S) da arginina e da glicina em água pura e em solução de glicerol 0,5 mol.L⁻¹.

Aminoácido	Água pura		Glicerol 0,5 mol.L ⁻¹	
	(g de aa/ 100 mL de solvente)		(g de aa/ 100 mL de solvente)	
	Valor obtido em cada experimento	Média	Valor obtido em cada experimento	Média
Arginina	84,84	85,84	81,01	81,43
	86,84		80,71	
	85,84		82,56	
Glicina	22,59	22,23	20,81	21,28
	21,65		21,83	
	22,44		21,19	

Tabela 2: Erro relativo entre os valores de limite de solubilidade (S) obtido por refratometria e aqueles relatados na literatura científica.

Aminoácido	Valores médios de S em água pura (g de aminoácido por 100 g de solvente)		
	S obtido por refratometria	S relatado na literatura científica	Erro relativo (%)
Arginina	85,1	85,3	0,23
Glicina	22,0	25,1	12,35

Tabela 3: Massa total (m_t) de arginina adicionada a alguns tubos contendo água pura e os correspondentes valores de índice de refração médio ($\eta_{\text{médio}}$) da alíquota do sobrenadante da solução formada por esses dois componentes, massa solubilizada (m_s), massa precipitada (m_p) calculada e a média da massa precipitada medida.

m_t (g)	$\eta_{\text{médio}}$	m_s (g)	m_p calc. (g)	m_p medida (g)
0,25	1,43171	0,203	0,047	0,049
0,30	1,44000	0,209	0,091	0,108
0,35	1,44083	0,211	0,139	0,167

Tabela 4 Energia livre padrão de transferência (ΔG°_t) para glicina e arginina de água pura para solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e energia livre padrão de transferência para a cadeia lateral ($\delta\Delta G^\circ_t$) da arginina nessas mesmas condições.

Aminoácido	ΔG°_t (cal.mol ⁻¹)	$\delta\Delta G^\circ_t$ (cal.mol ⁻¹)
Arginina	31,23	5,37
Glicina	25,86	-



Figura 12: A) Vórtex sem borracha; B) Vórtex com borracha.

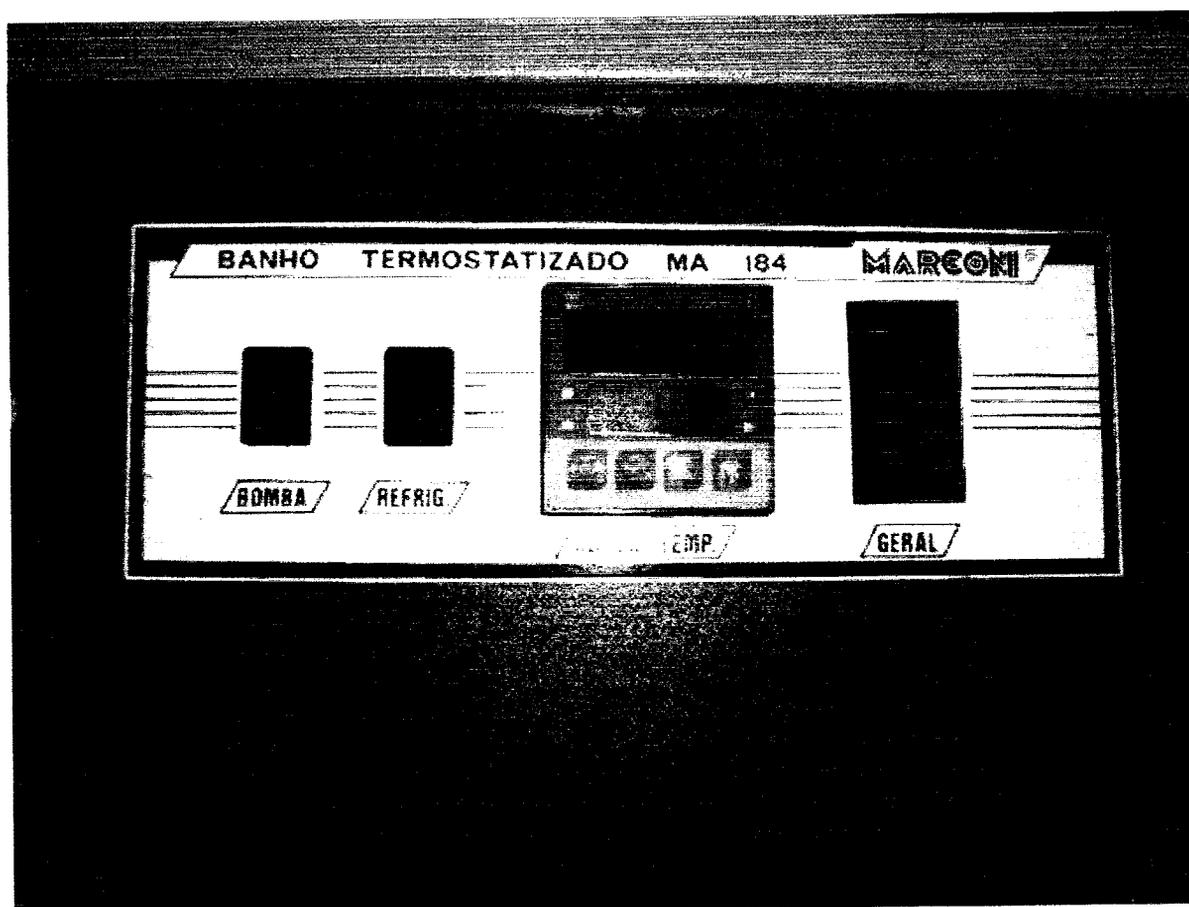


Figura 13: Painel de controle do Banho de imersão termostatizado com refrigeração (Marconi)

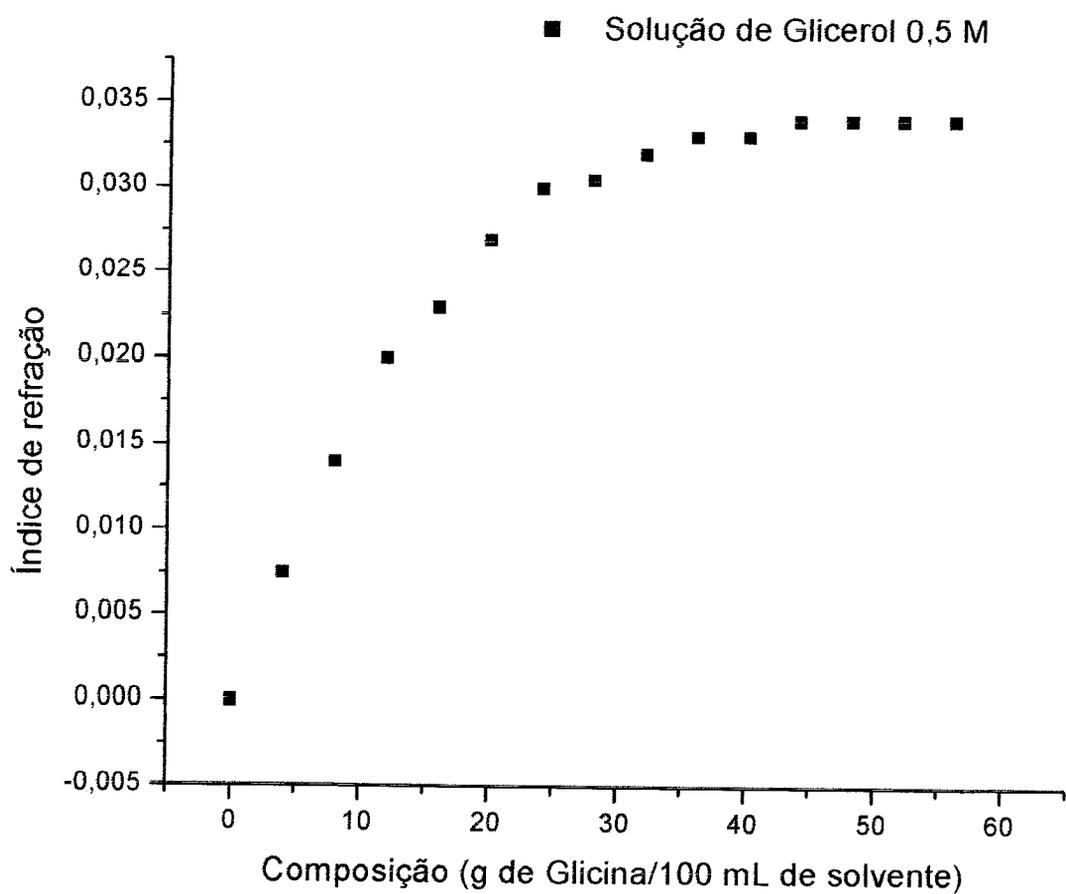


Figura 14: Exemplo de gráfico que descreve a variação do índice de refração das alíquotas do sobrenadante da solução de aminoácido.

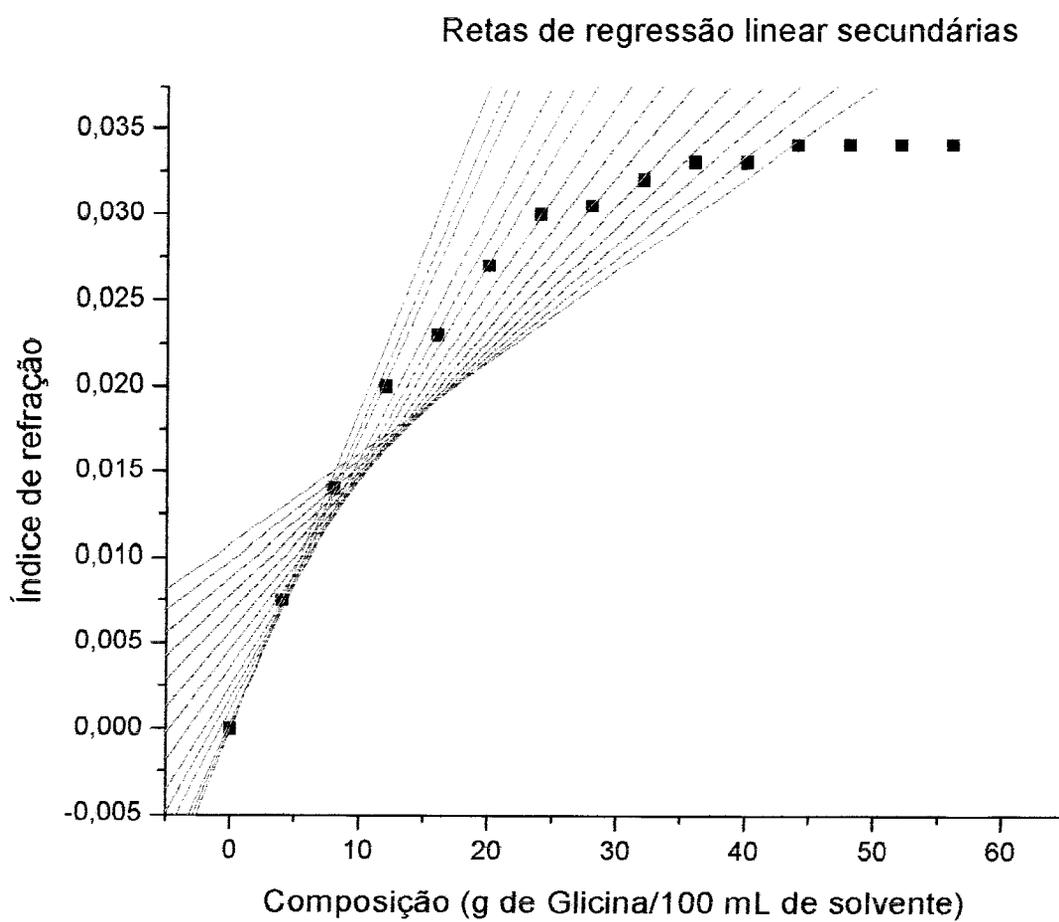


Figura 15: Retas de regressão linear secundárias.

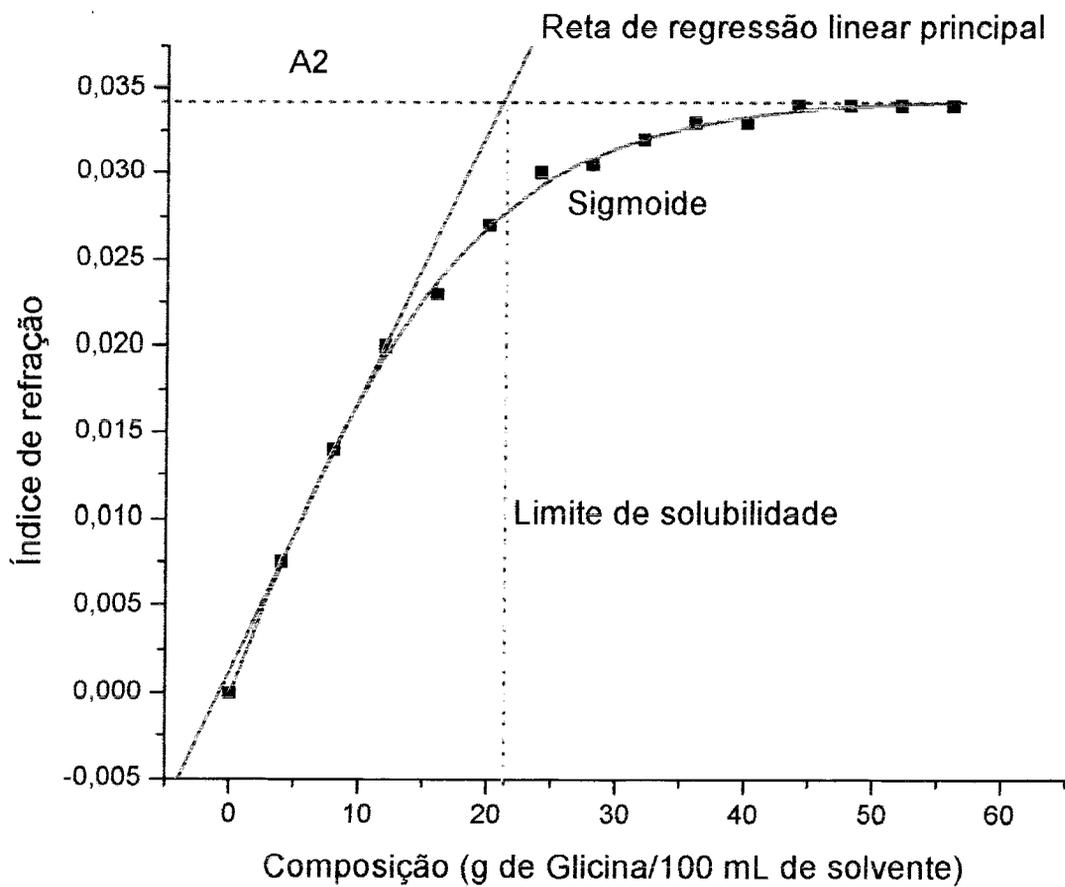


Figura 16: Intersecção entre a reta de regressão linear principal e a reta representativa do termo A2 da sigmóide.

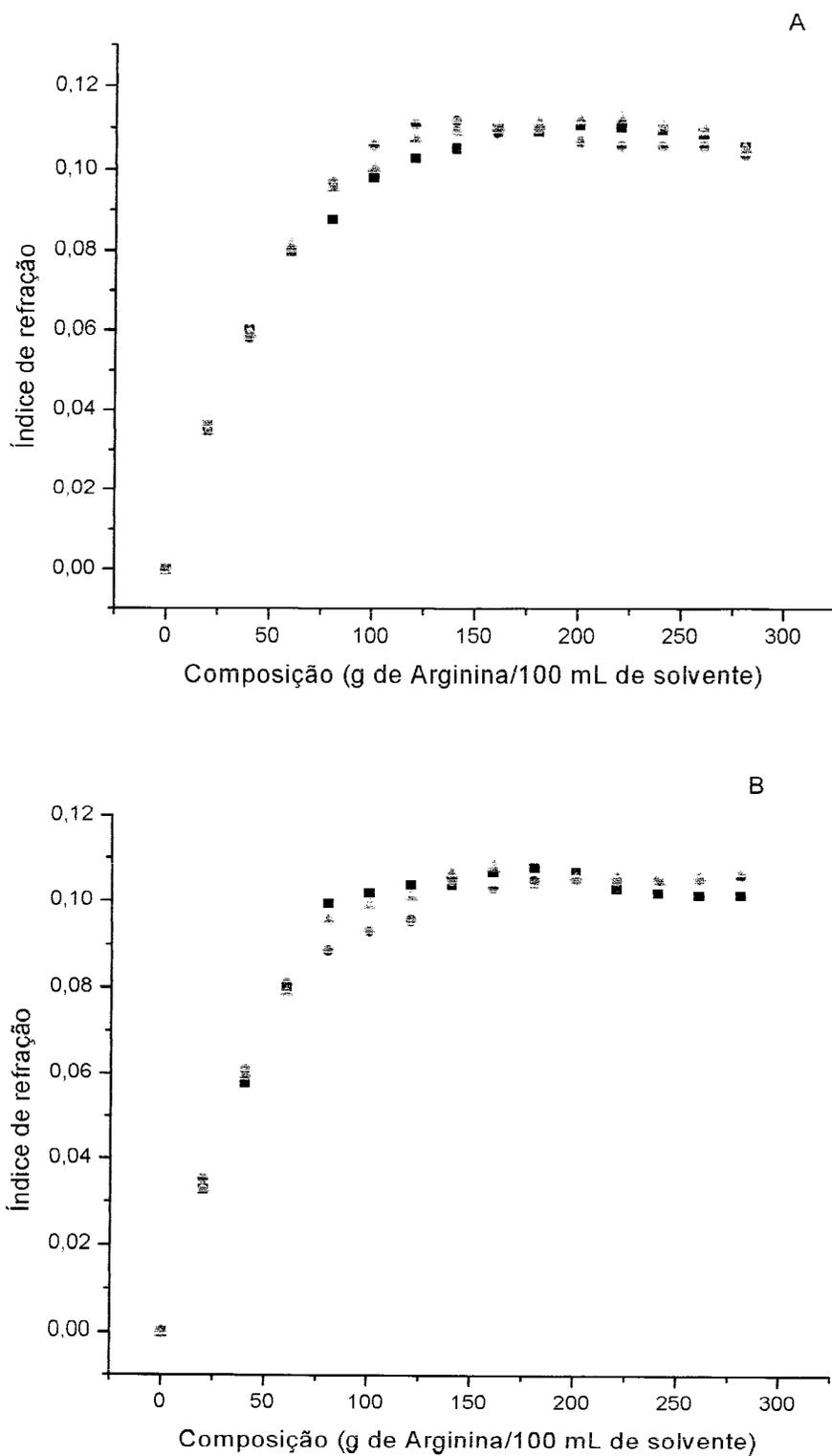


Figura 17: representação do perfil de solubilidade da arginina em água pura (painel A) e em solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de glicerol (painel B) a partir do cálculo dos índices de refração para a arginina presente nas alíquotas obtidas do sobrenadante

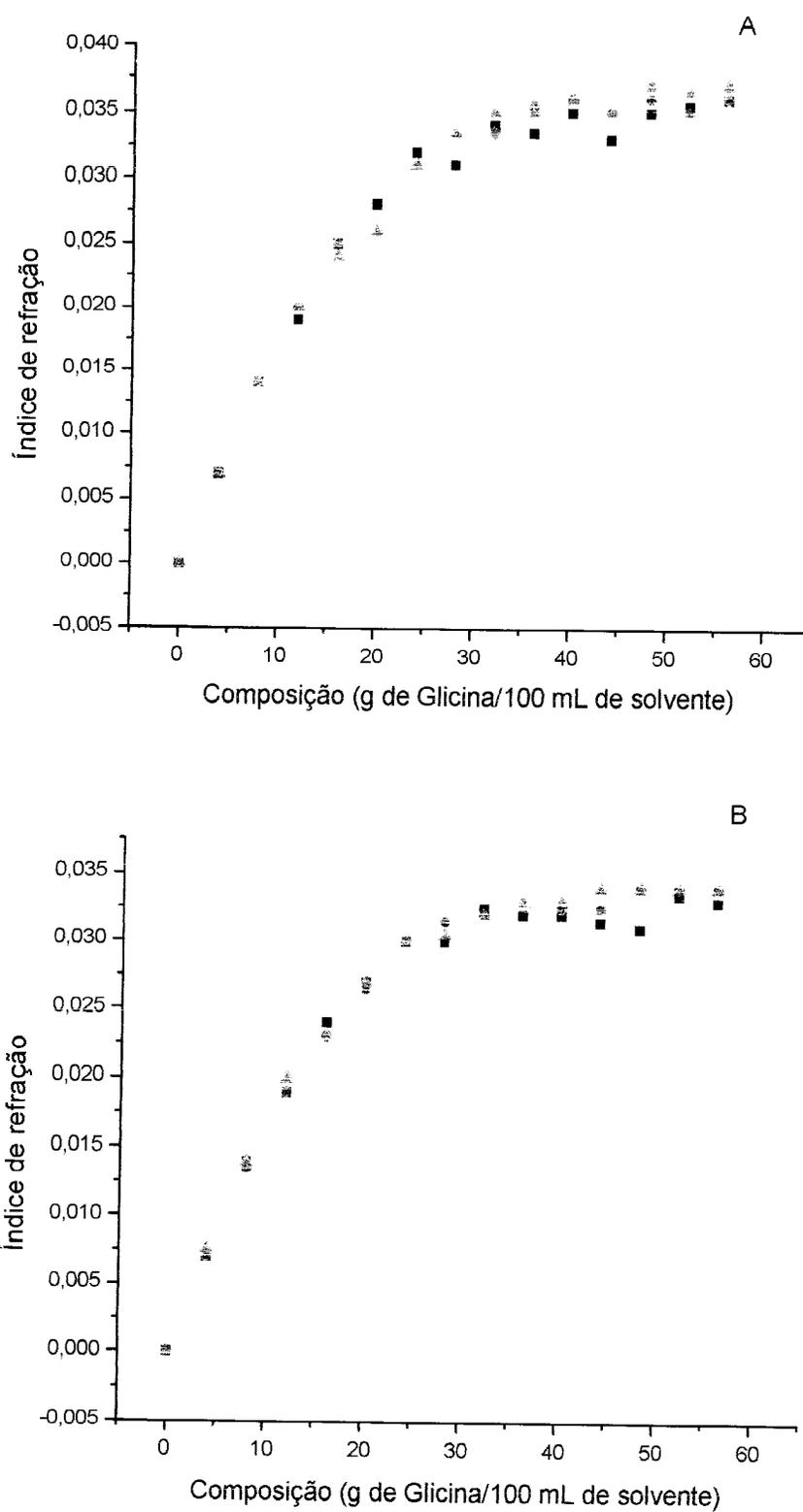


Figura 18: representação do perfil de solubilidade da glicina em água pura (painel A) e em solução 0,5 mol.L⁻¹ de glicerol (painel B) a partir do cálculo dos índices de refração para a glicina presente nas alíquotas obtidas do sobrenadante

4. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para a obtenção do limite de solubilidade a partir da análise de refração de alíquotas do sobrenadante das soluções com arginina e glicina mostrou ser confiável, pois os valores de limite de solubilidade calculados para esses dois aminoácidos foram condizentes com aqueles relatados na literatura. Além disso, as equações utilizadas no método envolvido no cálculo do limite de solubilidade puderam ser usadas com sucesso para o cálculo da massa de precipitado, a qual foi confirmada por gravimetria.

Constatamos que a transferência da cadeia lateral da arginina de água pura para solução de glicerol a 25 °C é um processo desfavorável, pois envolve um aumento de energia livre.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, F.; RISHI, V.; AHMAD, F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of Sabilization of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1476, p. 75-84, 2000.

ATKINS, P. W. **Físico-Química**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 252 p., 1999.

BASKAKOV, H.; BOLEN, D. W. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. **The Journal of Biology Chemistry**. v. 273, n. 9, p. 4831-4834, 1998.

BOLEN, D. W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in pr otein crystallization. **Metods**. v. 34, p. 312-322, 2004.

BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **J. Mol. Biol.** v. 310, p. 955-963, 2001.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, enginneering, and design of protein structures. In: **Introduction to Protein Structure**. Nova York e Londres: Garland Publisching, 1991. p. 247-266

FIELDS, P. A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 129, p. 417-431, 2001.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. **Biochemistry**. v. 20, p. 4667-4676, 1981.

KANG, N. S.; YU, J. Y.; JHON, M. S. Effect of cosolvent on a tripeptide solution using molecular dynamic simulations. **Journal of Molecular structure**. v. 355, p. 201-209, 1995.

LEE, J. C. Biopharmaceutical formulation. **Current opinion in biotechnology**. v. 11, p. 81-84, 2000.

LESK, A. M. Hydrophobicity – getting into hot water. **Biophysical Chemistry**. v. 105, p. 179-182, 2003.

LIU, Y.; BOLEN, D. W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**. v. 34, p. 12884-12891, 1995.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica**. 7. ed. São Paulo: Ateneu, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: SARVIER, 950 p., 2002.

NOSOH, Y.; SEKIGUCHI, T. Protein engineering thermostability. **Tibtech**. v. 8, p. 16-20, 1990.

NOZAKI, Y.; TANFORD, C. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. **Journal of Biological Chemistry**. v. 238, n. 12, p. 4074-4081, 1963.

QU, Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **Proc. natl. Acad. Sci.** v. 95, p. 9268-9273, 1998.

RISHI, V.; ANJUM, F.; AHMAD, F.; PFEIL, W. Role of non-compatible osmolytes in the stabilization of proteins during heat stress. **Biochem. J.** v. 329, p. 137-143, 1998.

SCHELLMAN, J. A. Fifty years of solvent denaturation. **Biophysical chemistry**. v. 96, p. 91-101, 2002.

SOMERO, G. N. Protein adaptations to temperature and pressure: complementary roles of adaptive changes in amino acids sequence and internal milieu. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 136, p. 577-591, 2003.

TANFORD, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. **J. Am. Chem. Soc.** v. 84, p. 4240-4247, 1962.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: **Protein structure: a practical approach**. IRL Press, Oxford, 1989. p. 331-345.

TSAI, J.; GERSTEIN, M.; LEVITT, M. Keeping the shape but changing the charges: A simulation study of urea and its iso-steric analogs. **J. Chem. Phys.** v. 104, p. 9417-9430, 1996.

WANG, A.; BOLEN, D. W. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. **Biochemistry**. v. 36, p. 9101-9108, 1997.

WANG, A.; ROBERTSON, A. D.; BOLEN, D. W. Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A. **Biochemistry**. v. 34, p. 15096-15104, 1995.

YANCEY, P. H. Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. **Sci. Prog.** v. 87, p. 1-24, 2004.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte system. **Science**. v. 217, p. 1214-1222, 1984.