



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GLICEROL
SOBRE A ATIVIDADE DA N-ACETIL GLICOSAMINIDASE**

Aluno:

Mario da Silva Garrote Filho

Orientador:

Nilson Penha-Silva

Co-orientador:

Cirano José Ulhoa

UBERLÂNDIA - MG

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GLICEROL
SOBRE A ATIVIDADE DA N-ACETIL GLICOSAMINIDASE**

Aluno:

Mario da Silva Garrote Filho

Orientador:

Nilson Penha-Silva

Co-orientador:

Cirano José Ulhoa

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica na área de Bioquímica

UBERLÂNDIA – MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G243e Garrote Filho, Mario da Silva, 1981-
Efeitos de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da
n-acetil glicosaminidase / Mario da Silva Garrote Filho. - 2008.
59 f. : il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.

Co-orientador: Cirano José Ulhoa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Ulhoa, Ciro José. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.15



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GLICEROL
SOBRE A ATIVIDADE DA N-ACETIL GLICOSAMINIDASE**

Aluno:

Mario da Silva Garrote Filho

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:

Prof. Dr. Nilson Penha Silva (orientador)

Examinadores:

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro (UFMG)

Prof. Dr. Mauro Sola-Penna (UFRJ)

Data da defesa: 28/02/2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para elaboração da dissertação de mestrado foram contempladas.

Prof. Dr. Nilson Penha Silva

*À Termodinâmica,
por ter me mostrado o sentido da vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mario da Silva e Lauricesa Rosa Garrote, e também à minha irmã, Marília da Silva Garrote, pelo apoio, carinho e atenção.

Ao Professor Dr. Nilson Penha-Silva pela orientação, paciência, atenção, confiança e amizade, qualidades essas sempre presentes durante a realização de todo o trabalho.

Ao Professor Dr. Cirano José Ulhoa pela co-orientação e por me recebido de braços abertos em seu laboratório, tão como por ter feito importantes sugestões.

Ao Professor Dr. Tales Alexandre Aversi-Ferreira por ter me ajudado e motivado em minha jornada pelos caminhos da Ciência.

Ao Professor Dr. Roberto do Nascimento Silva pelas explicações e esclarecimentos sobre os procedimentos experimentais envolvidos no cultivo do fungo e na obtenção da enzima utilizados nesse trabalho.

À Professora Dr.a. Valdirene Neves Monteiro pelo apoio e boa vontade em ajudar, tão como pela determinação e disposição em manter o laboratório em bom funcionamento.

À Ms. Vanessa Oliveira Leitão, Fernando Medeiro Bastos, Fabyano Álvares Cardoso, Andrei Stecca Steindorff e demais colegas do laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás pela acolhida e apoio.

À Júnia de Oliveira Costa, Natássia Caroline Rezende Corrêa, Cleine Chagas da Cunha e demais colegas do laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia por ter proporcionado um agradável ambiente de trabalho.

À Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves e Lúbia Cristina Fonseca pelo apoio e amizade.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado, sem a qual a realização desse trabalho não teria sido possível.

Aos funcionários da pós-graduação da Universidade Federal de Uberlândia e da Universidade Federal de Goiás e também a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

INDICE

	Página
Abreviaturas	ix
Lista de figuras	x
Apresentação	1
Capítulo 1 – fundamentação teórica	3
Termodinâmica	4
Estabilidade de proteínas	4
Características gerais dos osmólitos	10
Mecanismo de ação dos osmólitos	11
Utilização dos osmólitos	14
Uréia	16
Quitinase	17
Perspectivas	19
Referências bibliográficas do capítulo 1	23
Capítulo 2 – trabalho experimental	30
Resumo	31
Abstract	32
Introdução	33
Material e métodos	36
Obtenção da enzima <i>N</i> -acetyl- β -D-glicosaminidase do fungo <i>Trichoderma harzianum</i>	36
Determinação da atividade da <i>N</i> -acetyl- β -D-glicosaminidase	36
Edição gráfica dos dados e cálculos dos parâmetros analisados	37
Resultados	38
Discussão	46
Efeito do glicerol em diferentes temperaturas	46
Efeito do glicerol na presença de uréia	50

Efeito do glicerol em pHs diferentes	52
Conclusões	53
Referências bibliográficas do capítulo 2	55

ABREVIATURAS

K_m	Constante de Michaelis-Menten
NAGase	<i>N</i> -acetil- β -D-glicosaminidase
pNP-NAG	p-nitrofenil- <i>N</i> -acetil-glicosamina
TMAO	Óxido de trimetilamina
V_{max}	Velocidade máxima de catálise de substrato por uma enzima

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Equilíbrio entre os ensembles nativo e desnaturado	20
Figura 2 Equilíbrio deslocado em direção ao ensemble desnaturado	21
Figura 3 Equilíbrio deslocado em direção ao ensemble nativo	22
Figura 4 Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase em diferentes temperaturas	39
Figura 5 Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na ausência de uréia, em 40 °C e pH 5,0.	40
Figura 6 Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de 0,5 mol.L ⁻¹ de uréia, em 40 °C e pH 5,0.	41
Figura 7 Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de 1,0 mol.L ⁻¹ de uréia, em 40 °C e pH 5,0.	42
Figura 8 Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de 1,5 mol.L ⁻¹ de uréia, em 40 °C e pH 5,0	43
Figura 9 Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de 2,0 mol.L ⁻¹ de uréia, em 40 °C e pH 5,0	44
Figura 10 Efeito de concentrações crescentes de glicerol em pH 5,0 e em pH 6,0	45
Figura 11 Esquema proposto para explicar a ação do glicerol sobre a NAGase	47

APRESENTAÇÃO

Vários fatores podem interferir na estabilidade de uma proteína, como a temperatura, o pH e presença de moléculas como o glicerol e a uréia. Temperaturas altas aumentam a agitação térmica da cadeia polipeptídica e tende a torná-la muito flexível, o mesmo acontece na presença de uréia. Isso favorece o desenovelamento da cadeia polipeptídica e conseqüente diminuição de atividade da proteína. Esse processo pode ser amenizado na presença de glicerol, que é um osmólito usado por diversos seres vivos em situações de estresse, como escassez de água, temperaturas e pressões elevadas, dentre outras. O glicerol também pode ser usado na cristalização de proteínas, bem como para aumentar a estabilidade de eritrócitos.

Cada uma das diferentes possíveis conformações que uma proteína pode apresentar recebe o nome de microestado. E o conjunto de microestados que correspondem a um mesmo macroestado denomina-se “ensemble”. Para evitar anglicanismo, usamos o termo “estado” no lugar de “ensemble”.

Tradicionalmente, considera-se que uma proteína pode existir em dois estados (ou “ensembles”), o estado nativo e o estado desnaturado. O estado nativo seria composto por microestados que correspondem a proteínas funcionais, enquanto o estado desnaturado seria formado por microestados que estão associados a proteínas incapazes de desempenhar a sua função. Além disso, esses dois estados estão em equilíbrio.

O equilíbrio entre o estado nativo e o estado desnaturado pode ser alterado pela presença de glicerol. Isso acontece porque esse osmólito tende a aumentar ainda mais a diferença de energia livre do estado desnaturado em relação ao estado nativo. Desse modo, a transição de uma proteína do estado desnaturado para o estado nativo fica ainda mais difícil.

Este trabalho descreve experimentos realizados com a enzima *N*-acetil- β -D-glicosaminidase, obtida a partir do fungo *Trichoderma harzianum*, em diferentes temperaturas e concentrações de glicerol. Também verificamos o efeito do pH e de concentrações de uréia em 40 °C. Nessas condições, constatamos que há um aumento da atividade da enzima em concentrações menores de glicerol, que variam de 0,5 a 1,0 M. Em concentrações maiores de glicerol, como 1,5 e 2,0

mol.L⁻¹, há um gradual declínio da atividade da enzima a partir da atividade máxima. Para explicar esse comportamento duplo do glicerol, elaboramos um modelo baseado no conceito de microestados e estados.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

EFEITO DE SOLUTOS SOBRE PROTEÍNAS

Termodinâmica

Conceitos termodinâmicos, como o de energia livre e equilíbrio químico, são imprescindíveis para o entendimento dos mecanismos que atuam na estabilização de proteínas, que são moléculas fundamentais para a existência da vida.

Uma importante aplicação da Termodinâmica é a determinação do sentido de processos químicos. Um processo será espontâneo, ou seja, ocorrerá naturalmente sem interferência externa, se isso resultar em uma diminuição da energia livre. A vida segue esse princípio, tanto que os seres vivos podem ser considerados estruturas dissipativas (SCHNEIDER, KEY, 1994; PRIGOGINE, 1996). Essa dissipação de energia pode ser observada em vários processos biológicos, como o metabolismo e a fotossíntese.

De acordo com a Termodinâmica, cada ser vivo tem pelo menos um propósito, que é o de dissipar energia livre. Se não fosse por isso, os seres vivos entrariam em equilíbrio com o ambiente e morreriam. Na natureza, há outros exemplos de formação de estruturas complexas a partir da dissipação de energia, como é o caso de ventos e correntes marinhas. Assim, percebemos que a dissipação de energia é um imperativo no mundo natural. Isso reforça a hipótese Gaia, de acordo com a qual a Terra é um imenso ser vivo (SCHNEIDER, KEY, 1994; GARROTE-FILHO, PENHA-SILVA, 2005).

Estabilidade de proteínas

A formação de uma proteína tem início a partir da ligação sequencial de aminoácidos, o que resulta em uma fita, denominada cadeia polipeptídica. Essa fita então se enovela sobre si mesma, resultando na formação de uma estrutura tridimensional. Esse processo é conhecido como enovelamento. O processo contrário, no qual a estrutura tridimensional tende a se desfazer, denomina-se desenovelamento (NELSON, COX, 2002).

Vários fatores contribuem para a estabilização de uma proteína, o que significa que esses fatores são importantes para que a estrutura tridimensional de

uma proteína seja mantida. Esses fatores incluem o tipo de aminoácido que compõe a cadeia polipeptídica, interações hidrofóbicas e hidrostáticas, pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto, dentre outros (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN, TOOZE, 1991).

A glicina e prolina são aminoácidos que exercem efeitos opostos na flexibilidade de uma cadeia polipeptídica. A glicina torna essa estrutura mais flexível, enquanto a prolina faz com que ela fique mais rígida. Assim, a substituição de glicina por prolina aumenta da rigidez da cadeia polipeptídica (BRANDEN, TOOZE, 1991; FIELDS, 2001; FIELDS, SOMERO, 2001). O mesmo acontece quando ocorre a substituição de glicina por alanina (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990).

Os aminoácidos apolares também são importantes para que a estrutura tridimensional de uma proteína seja mantida. Isso acontece porque a cadeia lateral desses aminoácidos é hidrofóbica, o que determina uma repulsão entre essas cadeias e as moléculas de água. Assim, quando uma proteína se encontra em um meio aquoso, a sua cadeia polipeptídica se enovela de modo a esconder essas cadeias laterais hidrofóbicas do contato com a água (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990). Essa é a base da chamada interação hidrofóbica, que também é conhecida como força hidrofóbica (TANFORD, 1962).

Temos também as interações eletrostáticas, decorrentes da interação entre cargas elétricas das cadeias laterais de alguns aminoácidos polares. Essas interações podem tanto estabilizar como desestabilizar a estrutura de uma proteína. Cargas elétricas isoladas ou que formam pares de repulsão, por exemplo, tendem a tornar uma proteína instável e, conseqüentemente, propensa a sofrer desenovelamento. Por outro lado, quando as cargas elétricas de sinal contrário estão próximas, isso aumenta a estabilidade de uma proteína (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990).

Pontes de hidrogênio entre elementos da cadeia polipeptídica substituem as pontes de hidrogênio entre moléculas de água e a cadeia polipeptídica e por isso são importantes para tornar uma proteína mais estável (NELSON, COX, 2002). Já as pontes dissulfeto diminuem a mobilidade natural da cadeia polipeptídica (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN, TOOZE, 1991). Em uma proteína, vários desses fatores podem estar presentes ao mesmo tempo.

A manutenção da estrutura tridimensional de uma proteína é importante para que ela seja funcional. As proteínas que estão aptas a desempenhar a função para a qual foram sintetizadas são tradicionalmente consideradas pertencentes ao chamado estado nativo. Já aquelas que, por alguma razão, não conseguem fazer isso, fazem parte do chamado estado desnaturado (NELSON, COX, 2002).

Aparentemente, o ideal seria que uma proteína fosse bastante estável, pois assim a sua forma não sofreria alterações que pudessem torná-la inativa. E essa estabilidade está relacionada ao conteúdo de energia livre de uma proteína. Quanto menor for a quantidade de energia livre de uma proteína, menor será a tendência de que a estrutura dessa proteína sofra alterações que poderiam resultar em uma eventual perda de função. Portanto, maior é a estabilidade dessa proteína (NELSON, COX, 2002; TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989).

Uma proteína tenderá a permanecer no estado nativo se o seu conteúdo de energia livre nesse estado for menor do que aquele que haveria caso ela estivesse no estado desnaturado. E quanto maior esse desnível energético entre esses dois estados, menor seria a tendência de uma proteína em sofrer desenovelamento. Entretanto, nas proteínas que compõem os seres vivos, a diferença de energia livre entre os estados nativo e desnaturado é muito pequena (BRANDEN, TOOZE, 1991). Isso facilita a transição de uma proteína do estado nativo para o estado desnaturado, e vice-versa. Haverá um equilíbrio químico entre esses dois estados quando a transição de proteínas de um estado para outro for um processo reversível (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; FONSECA et al., 2006). Para fins didáticos, podemos comparar esse equilíbrio a uma caixa colocada sobre uma gangorra. Nessa caixa, encontram-se esferas azuis e vermelhas, que correspondem a proteínas do estado nativo e do estado desnaturado, respectivamente. Essas esferas estão separadas em lados diferentes. Quando a gangorra está paralela ao solo, os dois lados possuem a mesma quantidade de esferas (Figura 1). No entanto, se a gangorra é inclinada, as esferas migrarão para o lado que estiver mais baixo em relação ao solo e, conseqüentemente, a quantidade de esferas desse lado vai aumentar (Figuras 2 e 3). Isso acontece porque as esferas, tão como as proteínas, tendem a permanecer em estados de menor energia. No caso das esferas, a energia

envolvida é a energia potencial gravitacional e, no caso das proteínas, é a energia livre.

Em laboratório, é possível criar proteínas mais estáveis do que aquelas que existem na natureza. Por exemplo, podem ser feitas modificações nos genes que codificam uma determinada proteína para que ocorra a substituição de glicina por prolina em pontos estratégicos da cadeia polipeptídica. Desse modo, a estrutura protéica formada a partir do enovelamento dessa cadeia polipeptídica seria mais rígida. Esse estudo recebe o nome de evolução dirigida. Ao contrário da seleção natural, na qual as alterações genéticas que resultam em proteínas modificadas ocorrem ao acaso e em um longo período de tempo, na evolução dirigida esse processo ocorre de forma controlada e em um curto intervalo de tempo. Além disso, as proteínas obtidas a partir de evolução dirigida estão livres das restrições biológicas, pois são testadas fora do corpo. Isso permite a criação de proteínas para uso industrial, por exemplo (ARNOLD, 2001).

A possibilidade de criação de proteínas mais estáveis do que aquelas que existem atualmente demonstra que a evolução não explorou todas as possibilidades (ARNOLD, 2001). E já que parece tão vantajoso ter proteínas estáveis, por que a evolução não preferiu proteínas mais estáveis do que aquelas encontradas nos seres vivos atuais? (SOMERO, 2002).

A resposta está no fato de que a cadeia polipeptídica precisa ter certo grau de flexibilidade para que uma proteína possa desempenhar a sua função. Por exemplo, temos o caso das enzimas, que são proteínas que participam da transformação de um substrato em produto. Esse processo, conhecido por catálise, requer, primeiramente, que a enzima se ligue ao substrato. Essa ligação ocorre em uma região da enzima denominada sítio ativo. Alterações na estrutura da proteína podem alterar a forma do sítio ativo de modo que a enzima tenha dificuldade em reconhecer o substrato. Com isso, há uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato. Essa afinidade pode ser avaliada pelo valor da constante de Michaelis-Menten (K_m), que indica a quantidade de substrato necessária para que uma enzima alcance metade da sua velocidade máxima de catálise. E quanto menor o K_m , maior é a afinidade da enzima pelo substrato (NELSON, COX, 2002).

O fato de que a enzima se liga ao substrato não significa, necessariamente, que o substrato será catalisado. Essa é apenas uma das etapas do processo. Para que o substrato seja transformado em produto, a enzima precisa sofrer mudanças conformacionais, e por isso a sua estrutura precisa ter certo grau de flexibilidade. Se uma enzima fosse bastante estável, a sua estrutura teria maior rigidez. Desse modo, o sítio ativo estaria menos propenso a sofrer mudanças conformacionais que pudessem dificultar a sua interação com o substrato. Entretanto, para promover a catálise do substrato, a enzima requer uma estrutura com certo grau de flexibilidade. Portanto, com uma estrutura mais rígida, uma proteína se ligaria mais facilmente ao substrato, mas em compensação teria maior dificuldade em catalisá-lo (FIELDS, 2001; SOMERO, 2004).

Nos seres vivos, as proteínas estão sendo continuamente renovadas, em um processo denominado “turnover”. Nesse processo, proteínas antigas são degradadas e substituídas por proteínas novas, do mesmo tipo. É como se as proteínas possuísem uma data de validade. As taxas de síntese e degradação se equivalem, de modo que a concentração de uma determinada proteína permanece praticamente constante em condições normais no organismo. Entretanto, se essa proteína se tornasse mais estável, a célula poderia ter dificuldade em degradá-la. Se isso acontecesse, essa proteína se acumularia no organismo, pois a célula continuaria a produzir novas proteínas para substituir aquelas que deveriam ter sido destruídas. Esse acúmulo poderia fazer com que a proteína alcançasse níveis tóxicos para o organismo (ANJUM et al., 2000; ARNOLD, 2001).

A estabilidade ideal de uma enzima depende das condições do meio em que ela se encontra, como temperatura, por exemplo. E para que um ser vivo esteja adaptado a um determinado ambiente, isso significa que as suas proteínas precisam ser funcionais nesse ambiente. Caso contrário, essa seria uma situação incompatível com a vida (FIELDS, 2001).

Quanto à temperatura à qual estão adaptados, os seres vivos podem ser classificados como mesofílicos, termofílicos e psicofílicos. Os mesofílicos são aqueles que vivem em temperaturas que consideramos normais. Já os termofílicos são aqueles que requerem temperaturas bastante elevadas para que possam sobreviver. No outro extremo, os psicofílicos estão adaptados a

temperaturas muito baixas, como é o caso dos peixes antárticos (FIELDS, SOMERO, 1998).

Esses diferentes organismos podem ter enzimas que derivam de uma forma ancestral comum (ortólogos). Tais enzimas possuem a mesma função e estrutura bastante similar. Um exemplo de ortólogo é a lactado desidrogenase A (FIELDS, SOMERO, 1998; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003).

Os termofílicos possuem proteínas com estrutura menos flexível para compensar a agitação térmica do meio em que se encontram. No caso dos psicofílicos ocorre o contrário (HOYOUX et al., 2004). Uma das estratégias adotadas por esses organismos para obter enzimas com flexibilidade adequada para cada tipo de ambiente é a alteração da composição em glicina e prolina da cadeia polipeptídica. As proteínas dos termofílicos, por exemplo, possuem maior proporção de prolina em detrimento de glicina do que enzimas similares de organismos psicofílicos. Já em relação ao conteúdo de glicina ocorre o contrário (LOW, BADA, SOMERO, 1973; FIELDS, 2001).

Estudos revelaram que os peixes antárticos surgiram a partir de peixes mesofílicos. Um fato interessante é que muitos peixes antárticos possuem hemoglobinas rudimentares, enquanto alguns são até mesmo desprovidos dessa molécula. Isso acontece porque, devido à baixa temperatura do ambiente, tem-se um aumento da solubilidade do oxigênio no sangue, que é basicamente composto por água. Por isso, a hemoglobina torna-se desnecessária para o transporte de oxigênio. A presença de moléculas de hemoglobina rudimentares ou mesmo a ausência de hemoglobina tornam o sangue menos viscoso, o que reduz o custo energético para bombeá-lo (PRISCO, 2000; VERDE, PARISI, PRISCO, 2006).

Devido às condições da Terra primitiva, acredita-se que os primeiros seres vivos tenham sido termofílicos. Assim, os organismos mesofílicos, nos quais incluem os seres humanos, devem ter surgido a partir de organismos adaptados a temperaturas elevadas (LESK, 2003).

Características gerais dos osmólitos

Como acabamos de ver, uma proteína pode se tornar mais adaptada a um determinado ambiente devido a modificações em nível de cadeia polipeptídica, como a alteração da composição de aminoácidos da mesma. Esse tipo de adaptação é classificado como intrínseca. No entanto, a estabilidade de uma proteína também pode ser alterada por substâncias presentes no ambiente ao seu redor, sem que haja modificação da cadeia polipeptídica. Isso é denominado de adaptação extrínseca. A adaptação extrínseca pode envolver a participação de moléculas de pequeno peso molecular, coletivamente denominadas osmólitos. (FIELDS, 2001; FIELDS, WAHSTRAND, SOMERO, 2001; SOMERO, 2002).

O efeito dos osmólitos independe da história evolutiva de uma proteína. Ou seja, uma proteína pode ser estabilizada por osmólitos mesmo que não tenha evoluído na presença dos mesmos (YANCEY et al., 1982; YANCEY, 2004).

Os osmólitos podem ser acumulados em diversas situações de estresse, como escassez de água, extremos de temperatura e salinidade e altas concentrações de uréia (ANJUM, RISHI, AHMAD, 2000; SHARMA, DUBEY, 2004; VIANA, GARROTE-FILHO, PENHA-SILVA, 2005).

Bactérias halófilas são aquelas que vivem em ambientes cuja concentração de sal é bastante elevada. Há bactérias halófilas que estão tão bem adaptadas a ambientes desse tipo que as suas proteínas requerem concentrações elevadas de sal para que sejam ativas. Para que essas bactérias também pudessem ocupar ambientes com menor salinidade, elas teriam que possuir um novo conjunto de genes para codificar proteínas que fossem adaptadas a esse tipo de ambiente. Se essas bactérias usassem osmólitos, elas poderiam usar a mesma proteína em diferentes ambientes, e por isso iriam precisar de apenas um conjunto de genes para síntese de proteínas. O uso de osmólitos permitiria uma economia de genes, o que resulta na chamada simplicidade genética (YANCEY, et al., 1982; YANCEY, 2004).

Mecanismo de ação dos osmólitos

O mecanismo de ação dos osmólitos ainda não foi totalmente esclarecido. Atualmente há dois modelos que explicam isso. De acordo com um desses modelos, os osmólitos são excluídos preferencialmente da superfície de uma proteína, deixando para trás uma camada de moléculas de água ao redor da proteína, denominada camada de hidratação (GEKKO, TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; TIMASHEFF, 2002). Essa exclusão foi observada tanto experimentalmente, por meio de equilíbrio de diálise (TIMASHEFF, 1989), como em simulações de dinâmica molecular (KANG, YU, JHON, 1995).

A formação da camada de hidratação envolve um aumento de energia livre do sistema formado pela proteína e a camada de hidratação ao seu redor. Esse aumento de energia livre está relacionado ao tamanho da camada de hidratação. Assim, quanto maior o tamanho da camada de hidratação, maior é a quantidade de energia livre envolvida. E o tamanho da camada de hidratação, por sua vez, depende da superfície da proteína exposta ao solvente. Quanto menor a área da proteína em contato com o solvente, menor será a camada de hidratação. Desse modo, quanto menor a superfície da proteína exposta ao solvente, menor é o tamanho da camada de hidratação, resultando em um menor aumento de energia livre. Isso faz com que as proteínas do estado nativo sejam mais estáveis, porque tais proteínas, em geral, são mais compactas do que aquelas do estado desnaturado (ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; BASKAKOV, BOLEN, 1998; TIMASHEFF, 2002).

Como as proteínas existem em diferentes microestados, a ação dos osmólitos vai favorecer as proteínas do estado nativo, porque possuem uma conformação mais compacta. Experimentos mostraram que a estrutura da RNase A se torna mais compacta e menos caótica na presença de osmólitos (QUO, BOLEN, BOLEN, 1998). Como os microestados dos estados nativo e desnaturado se encontram em equilíbrio, é como se os osmólitos deslocassem esse equilíbrio em direção ao estado nativo (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; LEE, 2000). Isso aconteceria porque, na presença de osmólitos, a transição de uma proteína do

estado nativo para o estado desnaturado envolveria um custo energético maior do que aquele envolvido no caminho contrário (FIELDS, 2001; SOMERO, 2002).

Mas como e porque os osmólitos são preferencialmente excluídos da superfície de uma proteína? Essas perguntas podem ser respondidas por outro modelo que se propõe a explicar a ação dos osmólitos na estabilização de proteínas. De acordo com esse modelo, os osmólitos não interagem do mesmo modo com as diferentes partes de uma proteína. Por meio de experimentos envolvendo a energia livre de transferência de componentes de uma proteína de água pura para soluções de osmólitos, foi constatado que a interação entre osmólitos e o esqueleto peptídico de uma proteína é desfavorável. Ou seja, essa interação envolve um aumento de energia livre do sistema. Dependendo do aminoácido com o qual interagem, mais especificamente da cadeia lateral, essa interação pode resultar em um aumento ou diminuição da energia livre. Mesmo quando ocorre aumento da energia livre, esse acréscimo é quase insignificante quando comparado ao que ocorre quando os osmólitos interagem com o esqueleto peptídico (BOLEN, BASKAKOV, 2001).

Portanto, o esqueleto peptídico de uma proteína seria a fonte da exclusão preferencial dos osmólitos. Como a exposição do esqueleto peptídico é muito maior nas proteínas do estado desnaturado do que naquelas do estado nativo, o aumento de energia livre do estado desnaturado será maior do que aquele associado ao estado nativo (LIU, BOLEN, 1995).

A partir dos dois modelos propostos, podemos inferir que os osmólitos são excluídos preferencialmente da superfície de uma proteína porque interagem de modo desfavorável com o esqueleto peptídico de uma proteína (ANJUM, RISHI, AHMAD, 2000).

Ao promoverem a estabilização de uma proteína, os osmólitos são, de certo modo, repelidos da superfície da proteína. É como se houvesse uma repulsão entre os osmólitos e a proteína. Essa é, basicamente, a mesma origem do efeito hidrofóbico, que consiste na repulsão entre uma proteína e as moléculas do solvente aquoso no qual essa proteína se encontra. Devido a essa semelhança, a ação dos osmólitos na estabilização de proteínas tem sido denominada de efeito osmofóbico (WANG, ROBERTSON, BOLEN, 1995; BOLEN, BASKAKOV, 2001).

Os osmólitos são importantes para estabilizar proteínas em temperaturas altas (acima da temperatura ótima), permitindo que essa proteína continue funcional mesmo em temperaturas nas quais normalmente sofreria desnaturação e se tornaria inativa. Por outro lado, os osmólitos exercem pouco efeito em temperaturas baixas (abaixo da temperatura ótima da enzima). Isso acontece porque, em temperaturas altas, a proteína começa a se desnaturar, e com isso há um aumento da exposição do esqueleto peptídico. Portanto, os osmólitos têm um efeito maior sobre as proteínas do estado desnaturado. Em baixas temperaturas, por outro lado, a população de proteínas do estado nativo é maior. Com isso, há mais proteínas que apresentam uma conformação mais compacta, na qual o esqueleto peptídico está mais protegido do contato com o solvente aquoso, no qual se encontram os osmólitos. Isso explica porque o efeito protetor dos osmólitos sobre uma proteína aumenta com o aumento da temperatura (WANG, ROBERTSON, BOLEN, 1995; ANJUM, RISHI, AHMAD, 2000; LEE, 2000). Esse efeito protetor é importante para prevenir a inativação de enzimas em temperaturas elevadas (ZANCAN, SOLA-PENNA, 2005).

Entretanto, o aumento do efeito protetor dos osmólitos em decorrência do aumento da temperatura ocorre até certo ponto. Se a temperatura se torna elevada demais, a proteína pode sofrer desnaturação irreversível e com isso deixaria de ser sensível à ação dos osmólitos, já que esses compostos atuam apenas sobre as proteínas que participam do equilíbrio entre o estado nativo e o estado desnaturado (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989).

A proteção que os osmólitos conferem às proteínas poderia gerar inconvenientes se ocorresse em qualquer temperatura. O aumento da estabilidade de uma proteína sintetizada por um determinado ser vivo poderia dificultar a degradação dessa proteína. Com isso, essa proteína iria se acumular no organismo e então se tornaria tóxica. Entretanto, como o efeito da maioria dos osmólitos é mais intenso em temperaturas altas, isso não chega a afetar consideravelmente o “turnover” de uma proteína (ANJUM, RISHI, AHMAD, 2000).

A eficácia dos osmólitos depende do tipo de osmólito utilizado, da concentração do osmólito e da existência de algum fator capaz de promover desnaturação da proteína, como temperatura elevada, uréia, dentre outros. E quanto maior a diferença de energia livre entre o estado nativo e o estado

desnaturado provocada pelo osmólito, maior vai ser o efeito protetor do osmólito (QUO, BOLEN, BOLEN, 1998; ANJUM, RISHI, AHMAD, 2000). Por exemplo, a energia livre de transferência de uma proteína de água pura para uma solução de osmólito é maior quando esse osmólito é o óxido de trimetilamina (TMAO) do que a prolina (BOLEN, BASKAKOV, 2001).

Para que exerçam efeito, muitos osmólitos precisam ser usados em concentrações elevadas, que vão de 0,5 M a 2,0 M. Apesar de exercerem pouco efeito em temperaturas baixas, os osmólitos podem tornar a estrutura de uma proteína tão rígida ao ponto de que isso provocasse redução da atividade da mesma (FIELDS, 2001; SOMERO, 2002).

Utilização dos osmólitos

A ação dos osmólitos pode ser direta ou indireta. Na ação direta, são os próprios osmólitos que estabilizam a proteína. Na ação indireta, os osmólitos estabilizam chaperonas, que são proteínas que participam no enovelamento de proteínas sintetizadas pela célula. As chaperonas também podem atuar no re-enovelamento de proteínas que se desenovelaram parcialmente em decorrência de temperaturas elevadas, e por isso também são conhecidas como proteínas de choque térmico (HSP, em inglês) (ARAKAWA et al., 2006).

A aplicação dos osmólitos é muito mais ampla. Essas moléculas podem ser usadas na estabilização de proteínas mesofílicas para que se mantenham funcionais em temperaturas elevadas, nas quais normalmente sofreriam desnaturação e, conseqüentemente, perda de atividade. Para isso, podem ser usadas enzimas obtidas de diversos seres vivos, como *Sacharomyces cerevisiae* (TAYLOR et al., 1995), microorganismos das profundezas oceânicas (SOMERO, 2002). Esse efeito protetor dos osmólitos é importante porque muitos procedimentos biotecnológicos requerem a utilização de temperaturas elevadas (ZANCAN, SOLA-PENNA, 2005).

Também é viável utilizar os osmólitos na cristalização de proteínas. Na presença de osmólitos, há um aumento da energia livre das proteínas em solução devido à formação de uma camada de hidratação ao redor dessas proteínas. Para

reduzir a superfície de interação com o solvente e, conseqüentemente a extensão da camada de hidratação ao redor, essas proteínas se agregam e então se precipitam. Isso agiliza o processo de cristalização sem que as proteínas envolvidas sejam danificadas (BOLEN, 2004).

Outra possibilidade é usar os osmólitos para restaurar a atividade de enzimas purificadas. Isso se justifica pelo fato de que muitas enzimas possuem estabilizadores naturais podem ser removidos durante o processo de purificação. Os osmólitos, por terem uma ação bastante genérica, que independe da história evolutiva da proteína, poderiam compensar a ausência desses estabilizadores naturais (ARAKAWA et al., 2006).

Muitas doenças envolvem falhas no enovelamento de proteínas. Essas falhas podem resultar em proteínas que se enovelaram incorretamente ou apenas parcialmente (STEFANI, 2004). Proteínas defeituosas podem se agregar e se tornar tóxicas para as células, tal como ocorre em algumas doenças como Alzheimer e Parkinson. Mesmo quando as proteínas defeituosas são reconhecidas e destruídas pela própria célula, isso ainda pode causar problemas, pois o retículo endoplasmático rugoso persiste na síntese de proteínas defeituosas a uma taxa elevada, o que resulta no desgaste dessa organela (ARAKAWA et al., 2006). Os osmólitos podem ser usados no tratamento dessas doenças (ZANCAN, SOLA-PENNA, 2005). No entanto, para serem eficazes, os osmólitos precisariam atuar dentro da célula. No entanto, o intervalo de concentração em que os osmólitos são efetivos é demasiadamente elevado para muitos seres vivos, inclusive os humanos. Esse é um dos principais fatores que limita o uso farmacológico dos osmólitos (LEE, 2000; ARAKAWA et al., 2006).

Osmólitos, como o glicerol, também podem desempenhar uma importante função na conservação de sangue porque promove a estabilização de eritrócitos, mesmo em condições adversas como a presença de etanol em baixas concentrações (CUNHA et al., 2007).

Uréia

Existem moléculas, como é o caso da uréia e da arginina, que desestabilizam a estrutura da proteína, tornando-a mais suscetível a sofrer desnaturação (TANFORD, 1962; ANJUM, RISCHI, AHAMD, 1998). Por aumentarem a desorganização da estrutura de uma proteína, essas moléculas também são conhecidas como agentes caotrópicos (TAYLOR et al., 1995). Em oposição, os osmólitos aumentam a organização do solvente e por isso são designados por alguns autores como agentes cosmotrópicos (GALINSKI et al., 1997; MOELBERT, NORMAND, RIOS, 2004).

Não se sabe exatamente porque a uréia tem efeito caotrópico. Uma possibilidade é que a uréia promova uma redução do efeito hidrofóbico (BRESLOW, GUO, 1990). Outra possibilidade é que a uréia reduza o custo energético envolvido na formação da camada de hidratação ao redor das proteínas. Isso aconteceria porque a uréia desloca moléculas de água da camada de hidratação (NOZAKI, TANFORD, 1963; TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996).

Também é possível que a uréia induza a formação de cavidades delimitadas por moléculas organizadas de água no próprio solvente. Essas cavidades recebem o nome de clatratos. Peptídeos e até mesmo proteínas poderiam se encaixar nessas cavidades, com custo energético menor do que aquele que seria decorrente da formação de uma camada de hidratação ao redor dos mesmos (TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996).

A redução do custo energético para a formação da camada de hidratação ao redor de uma proteína, seja devido ao deslocamento de moléculas da camada de hidratação ou pela formação de clatratos, diminui a diferença de energia livre entre o estado nativo e o estado desnaturado. Isso favoreceria a transição de proteínas do estado nativo para o estado desnaturado (TAYLOR et al., 1995). Portanto, o equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado seria deslocado em direção ao estado desnaturado (SOMERO, 2002). Com isso, haveria um aumento da população de enzimas do estado desnaturado, que é composto por enzimas com uma estrutura menos organizada e que, em decorrência disso, são mais suscetíveis a mudanças conformacionais que alteram a forma do sítio ativo.

Conseqüentemente, a afinidade da enzima pelo substrato diminui, e isso resulta em uma diminuição da atividade da enzima (WANG, BOLEN, 1997).

A ação de moléculas caotrópicas não é necessariamente prejudicial. Alguns organismos usam o efeito caotrópico da uréia em benefício próprio. A uréia pode ser usada em vários processos biológicos, como retenção de água e inativação de enzimas durante hibernação, estado no qual há uma drástica redução do metabolismo (YANCEY et al., 1982; YANCEY, 2004).

Há várias teorias que buscam explicar os mecanismos envolvidos na estabilização de proteínas, mas ainda não se tem uma teoria unificada. Nos últimos 50 anos houve grande avanço nesse sentido, mas a busca continua (SCHELLMAN, 2002).

Quitinase

Com o objetivo de verificar o efeito do glicerol e da uréia na estabilização de proteínas, testamos diferentes concentrações dessas soluções, de até 2,0 mol.L⁻¹, na presença da enzima *N*-acetil-glicosaminidase (NAGase) secretada pelo fungo *Trichoderma harzianum*. Essa enzima é importante na degradação de quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante na Terra. A quitina é encontrada em diferentes organismos, como protozoários, aracnídeos, insetos, crustáceos, nematódeos, dentre outros. Por ser tão amplamente distribuída, a quitina é um importante reservatório transiente de carbono e oxigênio. Por atuarem na degradação da quitina, enzimas como a *N*-acetil-glicosaminidase possuem uma importante função na reciclagem do carbono e do oxigênio do solo (PARHAM, DENG, 2000).

No caso do *T. harzianum*, que é um micoparasita, a NAGase também é útil para atacar a parede celular de outros fungos (LORITO et al., 1993). Isso inclui fungos patogênicos como *Crinpellis pernicioso*, responsável por danos a pés de cacau (MARCO et al., 2000). Por isso, fungos como o *T. harzianum*, são denominados de antagonistas e a atividade que exercem no combate e contenção de fungos nocivos a outros seres vivos recebe o nome de biocontrole (MARCO et al., 2000).

Os modos de ação de fungos antagonistas incluem micoparasitismo, competição e antibiose (ELAD, 2000). Além de quitinases, muitas outras enzimas estão envolvidas na realização do biocontrole, e destacam-se aquelas que atacam a parede celular de fungos patógenos, como proteases, lipases e glucanases (LORITO et al., 1993; NORONHA, ULHOA, 2000; MARCO, VALADARES-INGLIS, FELIX, 2004). Acredita-se que as proteases dos fungos antagonistas neutralizam as enzimas produzidas por fungos patógenos (MARCO, VALADARES-INGLIS, FELIX, 2004).

Plantas também produzem proteases para que possam se proteger do ataque de microorganismos (HOORN, JONES, 2004). No entanto, as enzimas quitinolíticas de fungos antagonistas são mais efetivas do que aquelas produzidas por plantas e bactérias (LORITO et al., 1993).

O *Trichoderma harzianum* produz quitinases contra outros fungos, mas possui quitina em sua própria parede celular. Esse fungo é resistente às suas próprias enzimas quitinolíticas, até certa concentração. Dependendo da linhagem do fungo, essa concentração varia de 50 a 800 µg/mL. Não se sabe exatamente o que faz com que o *T. harzianum* seja resistente às suas próprias enzimas quitinolíticas. É possível que isso seja decorrente de modificações na composição bioquímica da parede celular desse fungo. Também pode ser que esse fungo libere inibidores contra as suas próprias enzimas no meio de cultura (LORITO, 1993).

Linhagens diferentes de *T. harzianum* podem produzir enzimas estruturalmente diferentes, mas que desempenham a mesma função. Esse é o caso da *N*-acetil-β-D-glicosaminidase (NAGase), cujos valores ótimos de pH e de temperatura variam de acordo com a linhagem do fungo a partir da qual a enzima foi obtida. Na literatura, tem sido relatado que os valores de pH ótimo da NAGase variam de 4,0 a 6,0, com picos em 4,0 (MARCO et al., 2000) e 5,5 (PERBERDY, 1991; PARHAM, DENG, 2000). Já a temperatura ótima da NAGase se estende de 37 a 65 °C, com picos em 37 (MARCO et al., 2000), 50 (ULHOA, PEBERDY, 1991) e 63 °C (PARHAM, DENG, 2000).

Experimentos revelaram que a aplicação de tunicamicina ao meio de cultura do *T. harzianum* fez com que a NAGase produzida e secretada por esse fungo apresentasse um menor conteúdo de carboidrato em sua superfície. Com

isso, a enzima ficou menos resistente ao ataque proteolítico promovido pela tripsina (ULHOA, et al., 2001).

Perspectivas

A *N*-acetil- β -D-glicosaminidase produzida pelo fungo do cerrado *Trichoderma harzianum*, pode ter aplicações industriais, pois ela ataca a parede celular de outros fungos, destruindo-os, sem causar malefícios aos seres humanos.

Pelo que sabemos, essa enzima não foi ainda utilizada em estudos sobre osmorregulação de proteínas. Os experimentos com a *N*-acetil- β -D-glicosaminidase permitirão ampliar o conhecimento sobre essa enzima, e também poderão esclarecer melhor o mecanismo de estabilização do glicerol, que é um osmólito amplamente utilizado para o transporte e estocagem de proteínas.

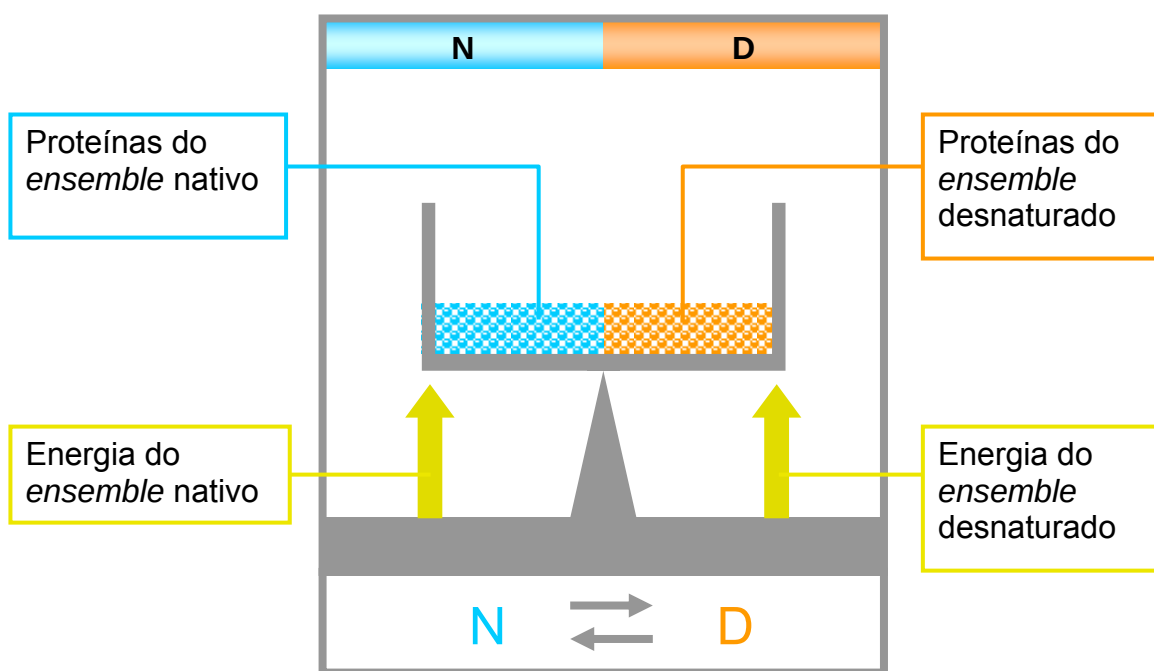


Figura 1: Equilíbrio entre o estado nativo e o estado desnaturado. No esquema acima, há uma caixa colocada sobre uma gangorra. Essa caixa contém esferas azuis e esferas alaranjadas, que correspondem ao estado nativo e ao estado desenovelado, respectivamente. Na nossa analogia, a energia de cada estado depende da altura do fundo da caixa em relação ao solo. Na situação acima, ambos os extremos da caixa possuem a mesma altura e por isso possuem a mesma energia. Desse modo, o equilíbrio entre esses dois estados não é favorecido para nenhum lado.

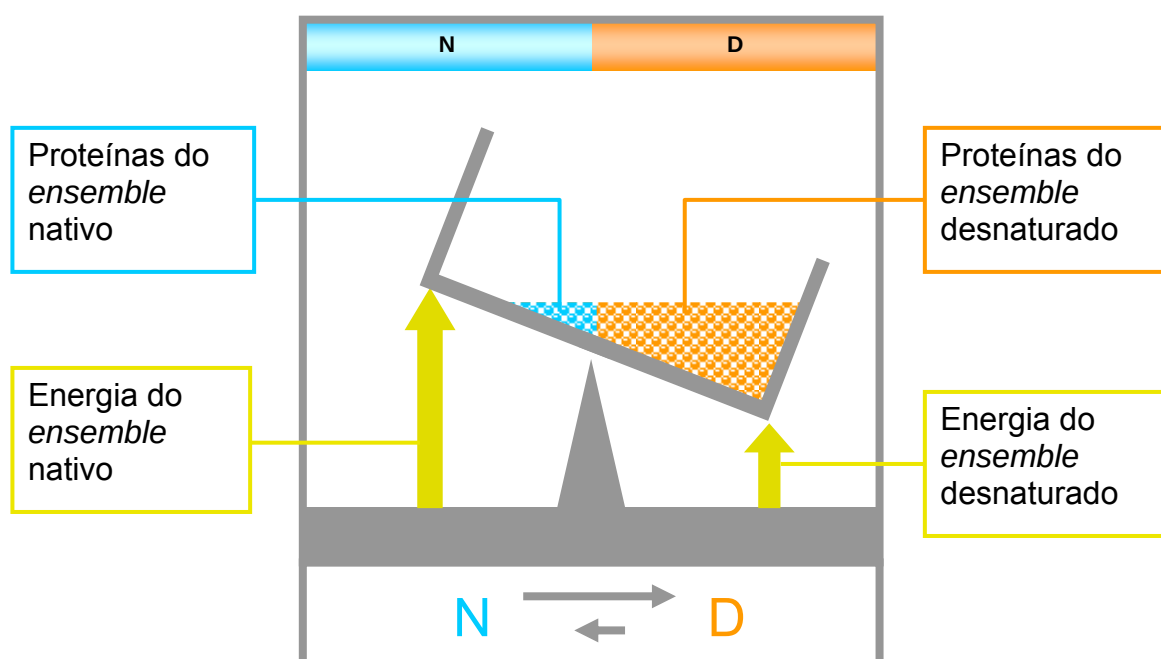


Figura 2: Equilíbrio deslocado em direção ao estado desnaturado. A caixa com as esferas azuis e alaranjadas foi inclinada em direção à direita. Com isso, a extremidade direita da caixa apresenta altura menor do que a extremidade esquerda. Consequentemente, as esferas migram do lado esquerdo para o lado direito. Elas fazem isso porque, agora, a energia associada ao lado direito é menor. Ao chegarem ao lado direito, as esferas azuis se transformam em esferas alaranjadas. Com isso, aumenta-se a quantidade de esferas alaranjadas em relação a esferas azuis. Na nossa analogia, isso significa que o equilíbrio entre o estado nativo e o estado desnaturado foi deslocado em direção ao estado nativo. Além disso, se a caixa fosse inclinada demais, algumas esferas alaranjadas poderiam sair da caixa (não mostrado). Com isso, a quantidade total de esferas dentro da caixa diminui. Se imaginarmos que as esferas são proteínas, isso significa que as esferas que derramaram são proteínas que sofreram desnaturação irreversível e, por não estar mais dentro da caixa, isso significa que essas proteínas não fazem mais parte do equilíbrio entre o estado nativo e o estado desnaturado.

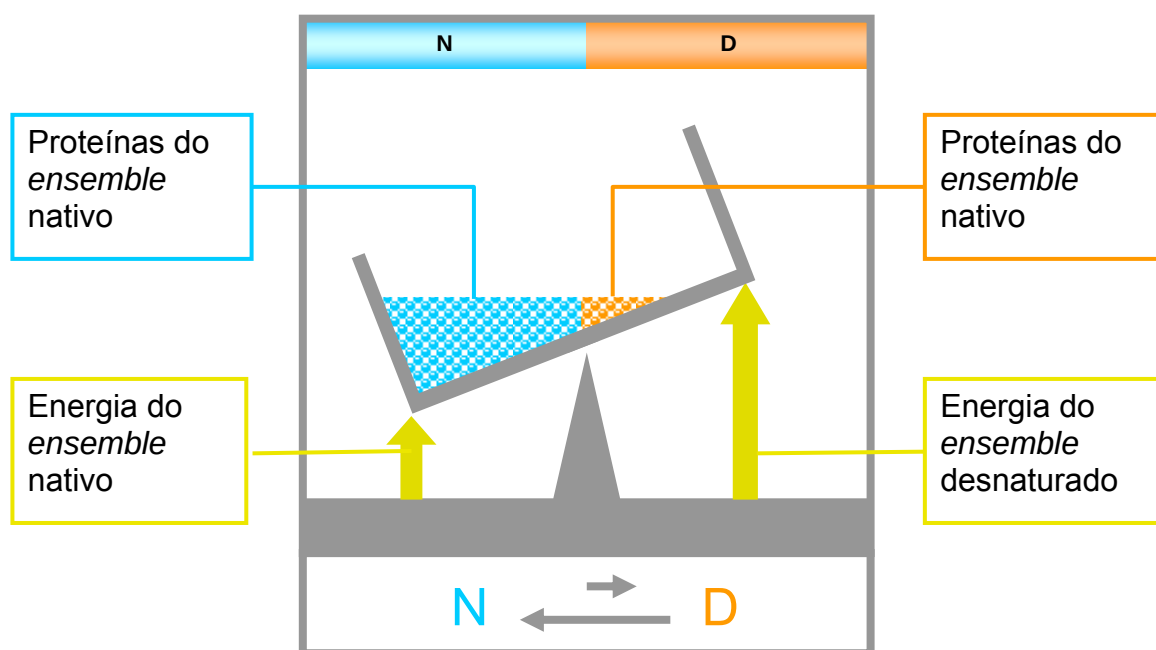


Figura 3: Equilíbrio deslocado em direção ao estado nativo. A caixa foi inclinada em direção à esquerda. Com base no que ocorreu na Figura 2, isso significa que o equilíbrio foi deslocado do estado desnaturado para o estado nativo porque agora o estado nativo possui menos energia do que o estado desnaturado. Do mesmo modo, se a caixa se inclinar demais para a esquerda, algumas esferas poderão sair da caixa (não mostrado). De acordo com a nossa analogia, isso corresponderia às enzimas que sofreram compactação irreversível, mas isso ainda não tem comprovação.

REFERÊNCIAS

- ANJUM, F.; RISHI, V.; AHMAD, F. (2000) Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1476, p. 75-84.
- ARAKAWA, T.; EJIMA, D.; KITA, Y.; TSUMOTO, K. Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1677-1687, 2006.
- ARNOLD, F. H.; WINTRODE, P. L.; MIYAZAKI, K.; GERSHENSON, A. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. **Trends in Biochemical Sciences**. n. 2, v. 26, fev. 2001.
- AUTON, M.; FERREON, A. C. M.; BOLEN, D. W. Metrics that differentiate the origins of osmolyte effects on protein stability: a test of the surface tension proposal. **Journal of Molecular Biology**, v. 361, p. 983-992, 2006.
- 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 protein crystallization. **Methods**. v. 34, p. 312-322, 2004.
- BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**. v. 310, p. 955-963, 2001.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, engineering, and design of protein structures. In: _____. **Introduction to Protein Structure**. Nova York e Londres: Garland Publishing, 1991. p. 247-266.
- BRESLOW, R.; GUO, T. Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers. **PNAS**. v. 87, p. 167-169, 1990.

CUNHA, C.C; ARVELOS, L. R.; COSTA, J. O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the satability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v. 19, p. 709-714, 2000

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

FIELDS, P. A.; SOMERO, G. N. Hot spot in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antartic notothenioids fishes. **PNAS**, v. 95, p. 11476-11481, 1998.

FIELDS, P. A.; WAHLSTRAND, B. D.; SOMERO, G. N. Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes. **European Journal of Biochemistry.**, v. 268, p. 4497-4505, 2001.

FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

GALINSKI, E. A.; STEIN, M.; AMENDT, B.; KINDER, M. The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 117, p. 357-365, 1997.

GARROTE-FILHO; PENHA-SILVA. Uma abordagem termodinâmica da vida. **Ciência Hoje**, v. 37, p. 34-39, 2005.

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

HOORN, R. A.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 7, p. 400-407, 2004.

HOYOUX, A.; BLAIZE, V.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; GRATIA, E.; HUSTON, A. L.; MARX, J. C.; SONAN, G.; ZENG, Y.; FELLER, G.; GERDAY, C. Extreme catalysts from low-temperature environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 317-330, 2004.

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.

LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSMO, A.; WOO, S. L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 302-307, 1993.

LOW, P. S.; BADA, J. L.; SOMERO, G. N. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. **PNAS**, v. 70, p. 430-432, 1973.

MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUZA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 383, 386, 2000.

MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by *Trichoderma*

harzianum strain which controls *Crinipellis pernicioso*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 70-75, 2004.

MOELBERT, S.; NORMAND, B.; RIOS, P. D. L. Kosmotropes and chaotropes: modeling preferential exclusion, binding and aggregate stability. **Biophysical Chemistry**, v. 112, p. 45-57, 2004.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 119-123, 2000.

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.

PACE, C. N.; SHIRLEY, B. A.; THOMSON, J. A. Measuring the conformational stability of a protein. In: **Protein structure: a practical approach**. IRL Press, Oxford, 1989, p. 311-330.

PARHAM, J. A.; DENG, S. P. Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1183-1190, 2000.

PRIGOGINE, I. **O fim das certezas**. 1. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2001. 199 p.

QUO, Y. Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolite-driven contraction of a random coil protein. **PNAS**. 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. **Biochemical Journal**. v. 329, p. 137-143, 1998.

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

SCHNEIDER, E. D.; KAY, J. J. Life as a manifestation of second law of thermodynamics. **Mathematical and Computer Modelling**, v. 19, p. 25-48, 1994.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Science**, v. 167, p. 541-550, 2004.

SILVA, R. N.; SILVA, S. P.; BRANDÃO, R. L.; ULHOA, C. J. Regulation of N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzinum*: evidence that cAMP controls its expression. **Research in Microbiology**. v. 155, p. 667-671, 2004.

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

SOMERO, G. N. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 321-333, 2004.

STEFANI, M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1739, p. 5-25, 2004.

TANFORD, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. **Journal of American Chemistry. Society**. v. 84, p. 4240-4247, 1962.

TANFORD, C. Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions. **Journal of American Chemistry. Society**. v. 86, p. 2050-2059, 1963.

TAYLOR, L. S.; YORK, P.; WILLIAMS, A. C.; EDWARDS, H. G. M.; MEHTA, V.; JACKSON, G. S.; BADCOE, I. G.; CLARKE, A. R. Sucrose reduces the efficiency

of protein denaturation by a chaotropic agent. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1253, p. 39-46, 1995.

TIMASHEFF, S. N. Solvent effects on protein stability. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 2, p. 35-39, 1992.

TIMASHEFF, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **PNAS**, v. 99, p. 9721-9726, 2002.

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. **Journal of Chemical Physiology**. v. 104, p. 9417-9430, 1996.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Current Microbiology**, v. 23, p. 285-289, 1991.

ULHOA, C. J.; SANKIEVICZ, D.; LIMEIRA, P. S.; PEBERDY, J. F. Effect of tunicamycin on N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1528, p. 39-42, 2001.

VIANA, Y. A.; GARROTE-FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 83-88, 2005.

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. **Science Progress**, v. 87, p. 1-24, 2004.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with whater stress: evolution of osmolyte system. **Science**. v. 217, p. 1214-1222, 1982.

ZANCAN, P.; SOLA-PENNA, M. Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 52-60, 2005.

CAPÍTULO 2

TRABALHO EXPERIMENTAL

EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE GLICEROL SOBRE A ATIVIDADE DA *N*-ACETIL GLICOSAMINIDASE

RESUMO

Experimentos realizados com a enzima *N*-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase), secretada pelo fungo *Trichoderma harzianum*, revelaram que o glicerol nas concentrações de 0,5 e 1,0 mol.L⁻¹ aumenta a atividade da enzima. Em concentrações de 1,5 a 2,0 mol.L⁻¹, o glicerol reduz a atividade dessa enzima. Isso foi verificado em diferentes temperaturas entre 30 e 70 °C e também em concentrações crescentes de uréia até 2,0 mol.L⁻¹. A redução da atividade da enzima foi maior na presença de uréia e glicerol do que na presença de uréia apenas. Um modelo fundamentado no conceito de microestados e estados foi elaborado para explicar o comportamento do glicerol.

Palavras-chave: *N*-acetil- β -D-glicosaminidase; *Trichoderma harzianum*; glicerol, uréia.

ABSTRACT

Experiments performed with the enzyme *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase), secreted by the fungus *Trichoderma harzianum*, reveal that glycerol concentrations of 0,5 and 1,0 mol.L⁻¹ increase the enzyme activity until a maximum value. Between 1,5 and 2,0 mol.L⁻¹, glycerol decreases the enzyme activity. This effect was observed at different temperatures of the interval between 30 and 70 °C and also in the presence of increasing urea concentrations until 2,0 mol.L⁻¹. The decrease in enzyme activity was larger in the presence of urea and glycerol than solely in the presence of urea. A model based in the concepts of microstates and ensembles was elaborated to explain the glycerol behavior.

Key words: *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase; *Trichoderma harzianum*; glycerol, urea

INTRODUÇÃO

A estrutura de uma proteína é formada pelo dobramento de uma cadeia peptídica e pode ser rígida ou flexível, dependendo das condições do meio (FIELDS, 2001; FIELDS, SOMERO, 1998; FIELDS, WAHLSTRAND, SOMERO, 2001; SOMERO, 2003; SOMERO, 2004). Essa estrutura pode apresentar várias conformações possíveis, denominadas de microestados (WANG, ROBERTSON, BOLEN, 1995; LEE, 2000; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003; FONSECA, 2006). Uma proteína pode mudar facilmente de um microestado para outro porque a energia envolvida nesse processo é pequena. Assim, uma proteína tem estabilidade marginal (BRANDEN, TOOZE, 1991; SOMERO, 2003; BOLEN, 2004).

O conjunto de microestados que correspondem a um mesmo macroestado é chamado de estado. Os microestados que correspondem a uma proteína funcionam formam o estado nativo, enquanto os microestados relacionados a proteínas inativas compõem o ensemble desnaturado (WANG, ROBERTSON, BOLEN, 1995; LEE, 2000; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003; FONSECA, 2006). Esses dois estados estão em equilíbrio quando uma proteína é capaz de se mover de um estado para outro reversivelmente. Muitos fatores podem mudar esse equilíbrio, como a temperatura (TIMASHEFF, 1989; TIMASHEFF, 1992, LEE, 2000; FONSECA et al., 2006).

A estabilização de proteínas pode ser intrínseca ou extrínseca (FIELDS, WAHLSTRAND, SOMERO, 2001). A estabilização intrínseca é relacionada à composição de aminoácidos da cadeia peptídica e envolve interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e pontes dissulfeto, por exemplo (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN, TOOZE, 1991; FIELDS, WAHLSTRAND, SOMERO, 2001). Por outro lado, a estabilização extrínseca depende de fatores ambientais, como a presença de pequenas moléculas orgânicas coletivamente denominadas osmólitos (YANCEY et al., 1982; FIELDS, WAHLSTRAND, SOMERO, 2001; YANCEY, 2004). Essa classe de moléculas inclui representantes de vários grupos, como açúcares, aminoácidos e polióis. Sacarose, prolina e glicerol são exemplos de osmólitos (YANCEY et al. 1982).

Os osmólitos são amplamente usados por muitas formas de vida, como microorganismos, plantas e animais. Esses organismos acumulam osmólitos durante condições de estresse, como níveis elevados de temperatura, pressão, salinidade e concentração de uréia (YANCEY et al, 1982; BOLEN, BASKAKOV, 2001; FIEDS, WAHLSTRAND, SOMERO, 2001; YANCEY, 2004). Humanos também se beneficiam do efeito dos osmólitos sobre a estabilidade de proteínas. Por exemplo, os osmólitos possuem importante aplicação na conservação de proteínas (VIANA, GARROTE-FILHO, PENHA-SILVA, 2005), biotecnologia (TAYLOR et al., 1995), cristalização de proteínas (BOLEN, 2004) e proteção de eritrócitos (CUNHA et al., 2007).

O mecanismo de ação dos osmólitos não foi ainda completamente elucidado. Muitas evidências sugerem que os osmólitos são excluídos preferencialmente da superfície da proteína com a qual interagem, deixando para trás uma camada de hidratação ao redor da proteína. A extensão dessa camada depende da superfície da proteína exposta ao solvente (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; KANG, YOU, JHON, 1995; ARAKAWA et al., 2006). Além disso, a formação da camada de hidratação tem um custo energético relacionado à sua extensão. Assim, esse custo energético será maior para proteínas desenoveladas do que para proteínas enoveladas (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; ARAKAWA et al., 2006).

Proteínas desenoveladas podem se enovelar para se livrar de parte da camada de hidratação, pois com isso passariam a ter um menor conteúdo energético (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; ARAKAWA et al., 2006). Assim, os osmólitos favorecem o enovelamento de proteínas porque promovem a contração da estrutura protéica (QUO, BOLEN, BOLEN, 1998). Isso significa que os osmólitos atuam sobre o equilíbrio entre o estado nativo e o estado desnaturado, deslocando-o em direção ao estado nativo (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; ARAKAWA et al., 2006).

De acordo com muitos resultados experimentais, a principal fonte de exclusão dos osmólitos a partir da superfície de uma proteína é a exposição do esqueleto peptídico (LIU, BOLEN, 1995; WANG, ROBERTSON, BOLEN, 1995; BOLEN, BASKAKOV, 2001). Como essa exposição é maior em situações de estresse, como temperaturas elevadas, isso explica porque muitos osmólitos têm

pouco ou nenhum efeito sob proteínas em condições fisiológicas (ANJUN, RISHI, AHMAD, 2000).

Contrastando com o efeito dos osmólitos, algumas moléculas provocam desnaturação de proteínas, como uréia (TANFORD, 1962) e arginina (TANFORD, 1962; RISHI, et al., 1998). Acredita-se que isso acontece porque a uréia se ligaria a proteínas e deslocaria moléculas de água da camada de hidratação, o que resultaria em uma diminuição do seu custo energético (TANFORD, 1963; TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996).

Para entender melhor o efeito do glicerol e da uréia, testamos essas substâncias na enzima *N*-acetil-glicosaminidase (NAGase) secretada pelo fungo *Trichoderma harzianum*. Essa enzima é importante para degradar quitina do solo e assim promover a reciclagem do carbono (PHARM, DENG, 2000). Como *T. harzianum* é um micoparasita, a NAGase também é útil para atacar a parede celular de outros fungos (LORITO et al., 1993). Isso inclui fungos patogênicos como *Crinpellis pernicioso*, responsável por danos a pés de cacau (MARCO et al., 2000). Desse modo, o *T. harzianum* desempenha uma importante função como agente de biocontrole (ELAD, 2000; MARCO et al, 2000). Proteases, lípases e glucanases também estão envolvidas no combate de fungos patogênicos (LORITO et al., 1993; NORONHA, ULHOA, 2000; MARCO, VALADARES-INGLIS, FELIX, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da enzima *N*-acetyl- β -D-glicosaminidase do fungo *Trichoderma harzianum*

A obtenção da NAGase seguiu o protocolo experimental utilizado pela equipe do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás (ULHOA, PERBERDY, 1991; SILVA, BRANDÃO, ULHOA, 2004) e outros autores (MARCO, VALADARES-INGLIS, FELIX, 2004). O fungo *T. harzianum* foi inicialmente repicado em placas de Petri contendo um meio sólido (0,5 g de extrato de malte, 0,25 g de extrato de levedura, 1,0 g de glicose, 2,0 g de agar e água em quantidade suficiente para completar 100 mL de volume) e incubado por 1 semana a 28 °C. Esporos obtidos desse meio de cultura foram transferidos para um meio líquido (1,0 g de peptona, 0,30 g de uréia, 2,0 g de KH_2PO_4 , 1,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,30 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mL de solução de elementos traços (SET) e 5,0 g de quitina, dissolvidos em quantidade suficiente de água para completar o volume de 1 L), e incubados durante 3 dias, a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. A solução da enzima foi obtida a partir de filtração a vácuo do extrato bruto obtido.

Determinação da atividade da *N*-acetyl- β -D-glicosaminidase

O procedimento utilizado para estimativa da atividade da NAGase a partir do fungo *foi baseado em descrições anteriores* (ULHOA, PERBERDY, 1991; SILVA, BRANDÃO, ULHOA, 2004; MARCO, VALADARES-INGLIS, FELIX, 2004) e adaptados para a utilização de concentrações crescentes de glicerol e de uréia, em diferentes temperaturas.

Em um típico ensaio de atividade, a uma série de tubos de ensaio eram adicionados 50 μL de solução da enzima e 350 μL de tampão acetato de sódio a 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5,0 ou 6,0, preparado na ausência e na presença de diferentes concentrações de glicerol e/ou uréia de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Após pré-

incubação dos tubos em banho-maria durante 5 minutos, para equilíbrio térmica, eram adicionados 100 μL de solução aquosa do substrato p-nitrofenil-*N*-acetil-glicosamina (pNP-NAG) a 5 mmol.L^{-1} . Após 20 minutos de incubação, a reação era interrompida com 1 mL de carbonato de sódio a 0,5 mol.L^{-1} . Os valores de absorvância registrados em 405 nm foram utilizados como estimativa da atividade da enzima.

Edição gráfica dos dados e cálculos dos parâmetros analisados

Os gráficos, cálculos e análises foram executados com o uso do programa Origin 7.5 (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, EUA). As retas de regressão linear somente foram consideradas significantes quando p foi menor do que 0,01. Nos experimentos com uréia, a comparação das médias foi feita mediante teste de Tukey.

RESULTADOS

A Figura 4 apresenta o efeito de concentrações crescentes de glicerol de até $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ sobre a atividade da NAGase entre 30 e 70 °C. Na ausência de glicerol, a NAGase apresenta maior atividade em 50 °C, o que é condizente com dados na literatura (ULHOA, PEBERDY, 1991). Nas diferentes temperaturas analisadas, concentrações de glicerol de 0,5 e/ou $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ aumentaram a atividade da enzima até um valor máximo, seguido de um declínio de atividade em concentrações de glicerol de 1,5 e $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$. O aumento da atividade promovido pelo glicerol é pouco expressivo em 30 °C, torna-se bastante evidente entre 40 e 60 °C e então diminui em 70 °C (Figura 4).

Os efeitos de concentrações crescentes de glicerol de até $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ sobre a atividade da NAGase na ausência de uréia (Figura 5) e em concentrações de uréia de 0,5 (Figura 6), 1,0 (figura 7), 1,5 (Figura 8) e $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figura 9) foram analisados a 40 °C e em pH 5,0. Na ausência de glicerol e em concentrações crescentes de uréia, houve redução da atividade da enzima. Esse resultado já era esperado, pois a uréia é um conhecido agente desnaturante (TANFORD, 1963; NOZAKI, TANFORD, 1963; WANG, BOLEN, 1997).

Comparando-se as Figuras de 5 a 9, pode-se perceber que na medida em que a concentração de uréia aumenta, o glicerol promove um aumento cada vez menor da atividade enzimática na ausência de uréia e em $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de uréia. A partir de $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de uréia, o glicerol se torna prejudicial para a enzima em concentrações cada vez menores. Por exemplo, nas concentrações de 1,0, 1,5 e $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de uréia, o glicerol se tornou prejudicial para a enzima a partir da concentração de 2,0, 1,0 e $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

O efeito da mudança do pH do meio de 5,0 para 6,0 está mostrado na Figura 10. Na ausência de glicerol, a enzima apresentou maior atividade em pH 5,0, o que é condizente com dados da literatura (ULHOA, PEBERDY, 1991). O aumento de atividade promovido pelo glicerol também foi maior em pH 5,0 do que em pH 6,0. Além disso, na medida em que a concentração aumenta, a atividade da enzima atinge um valor máximo, a partir do qual começa haver um declínio da atividade enzimática em concentrações de glicerol ainda maiores do que aquela em que a enzima apresentou atividade máxima em cada um dos pHs analisados.

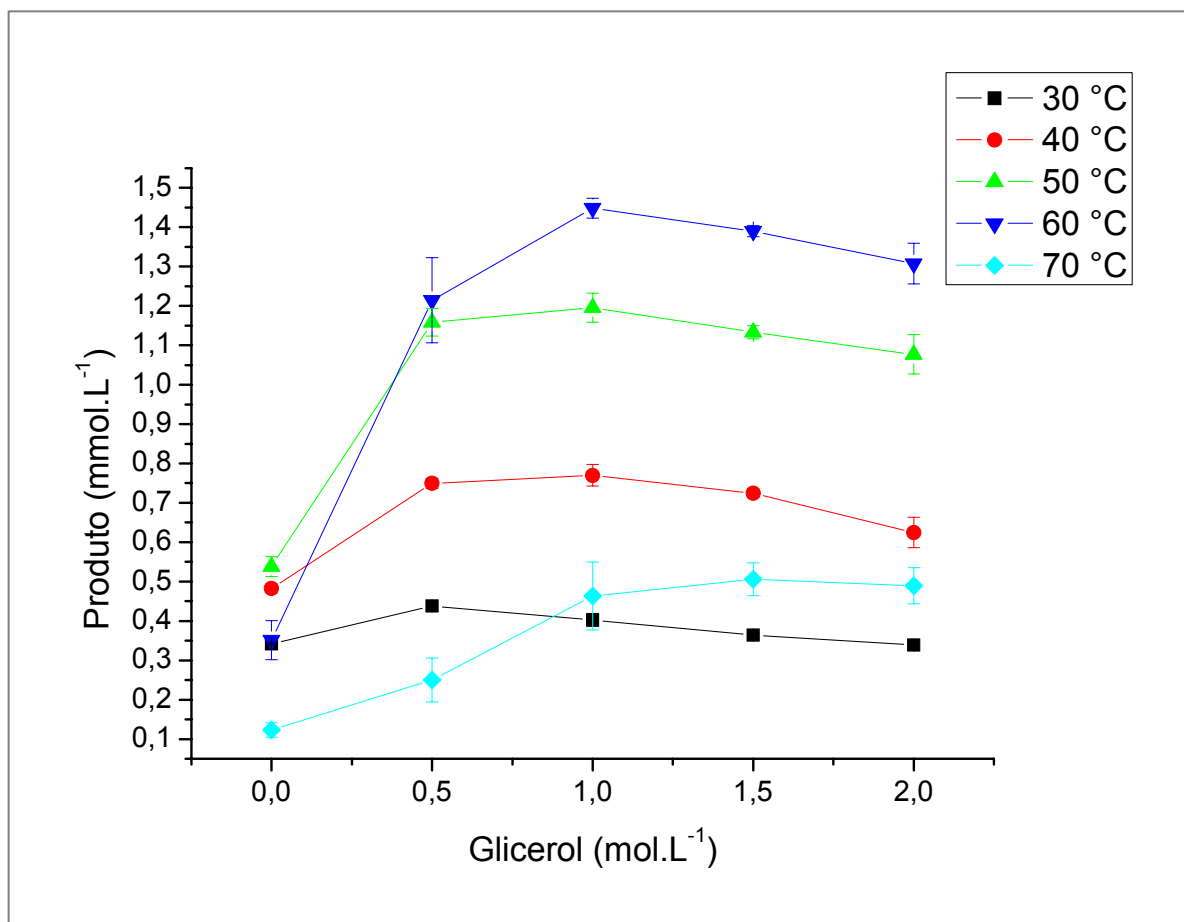


Figura 4: Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase em diferentes temperaturas. Os experimentos foram realizados a 30 (■), 40 (●), 50 (▲), 60 (▼) e 70 °C (◆), em pH 5,0. A atividade da enzima foi inferida a partir da quantidade de pNP-NAG formada durante 20 min a partir de uma quantidade fixa de enzima.

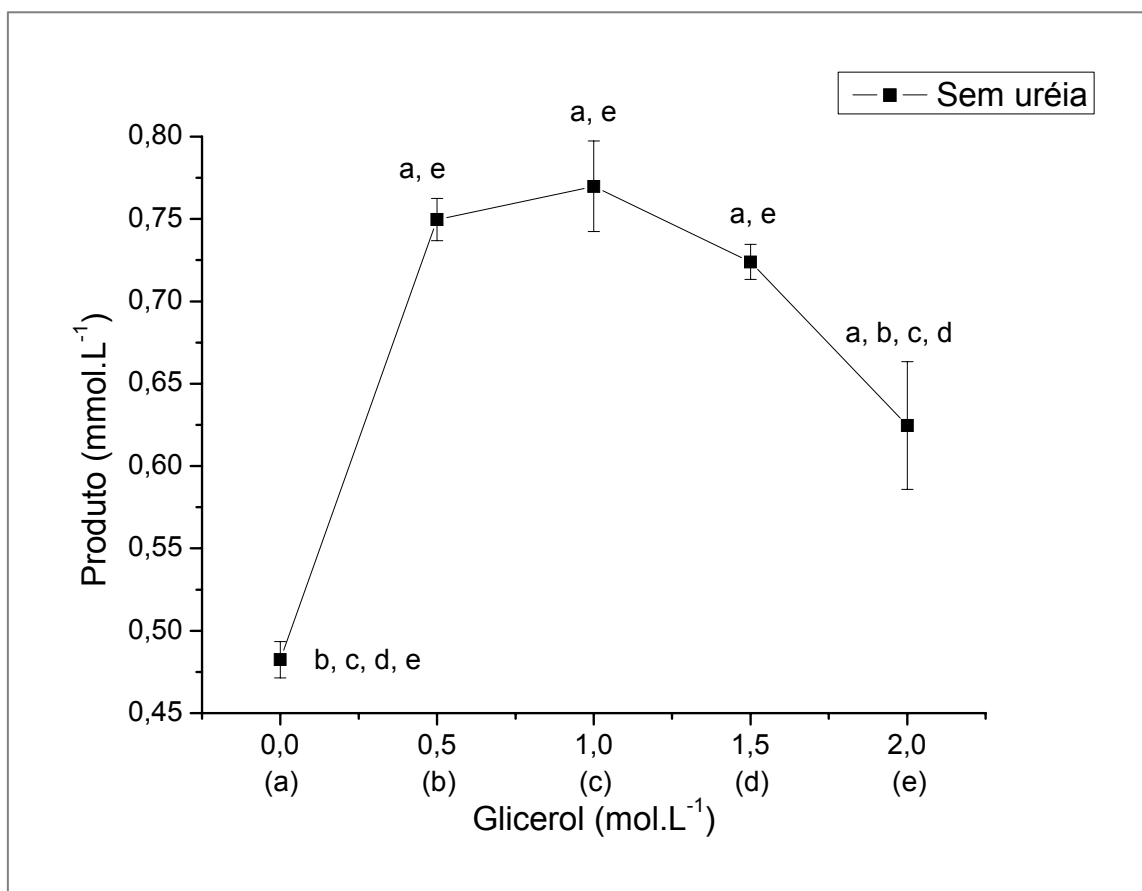


Figura 5: Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na ausência de uréia, em 40 °C e pH 5,0. As concentrações de glicerol de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 foram designadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente. As letras ao lado de cada ponto indicam que a atividade enzimática correspondente a concentração de glicerol nesse ponto é diferente daquela indicada pelas concentrações de glicerol dessas letras, conforme teste de Tukey.

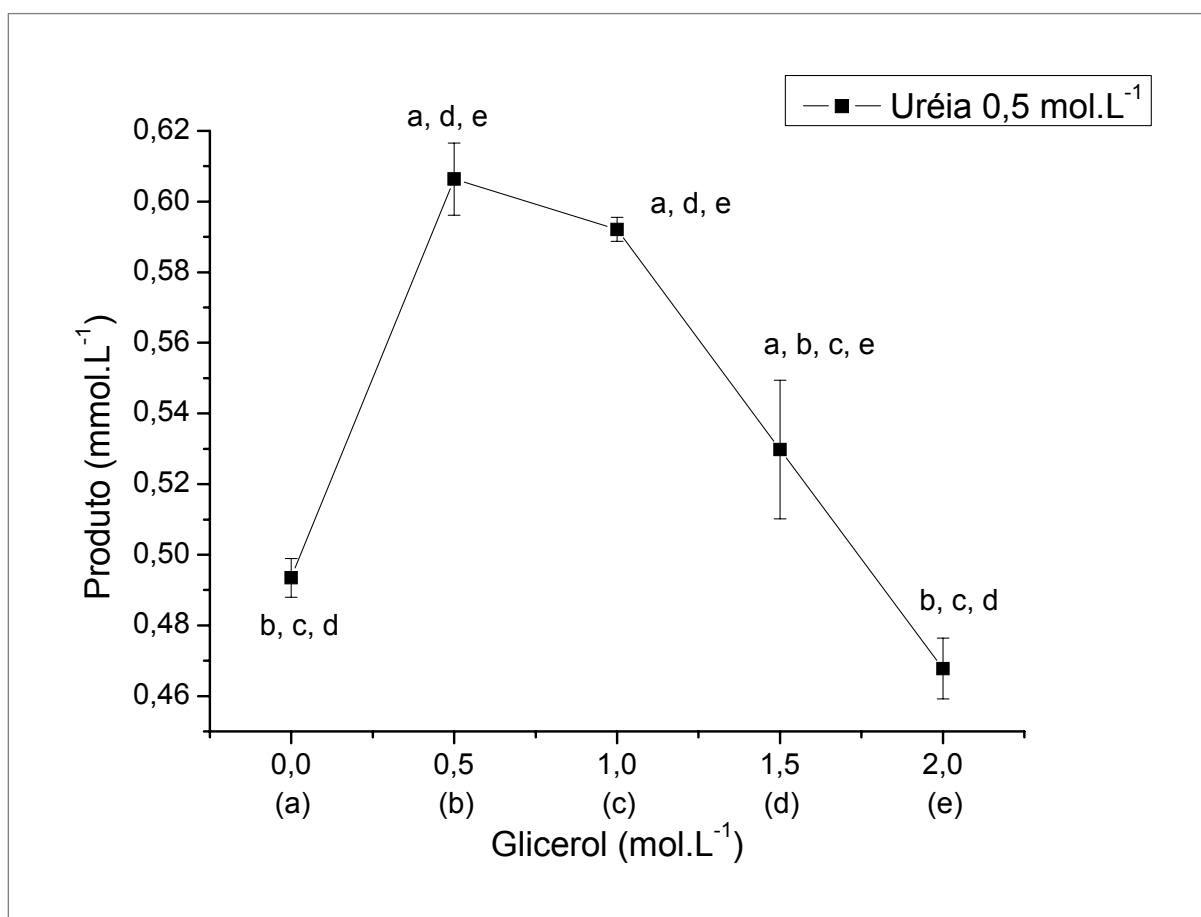


Figura 6: Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de 0,5 M de uréia, em 40 °C e pH 5,0. As concentrações de glicerol de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 foram designadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente. As letras ao lado de cada ponto indicam que a atividade enzimática correspondente a concentração de glicerol nesse ponto é diferente daquela indicada pelas concentrações de glicerol dessas letras, conforme teste de Tukey.

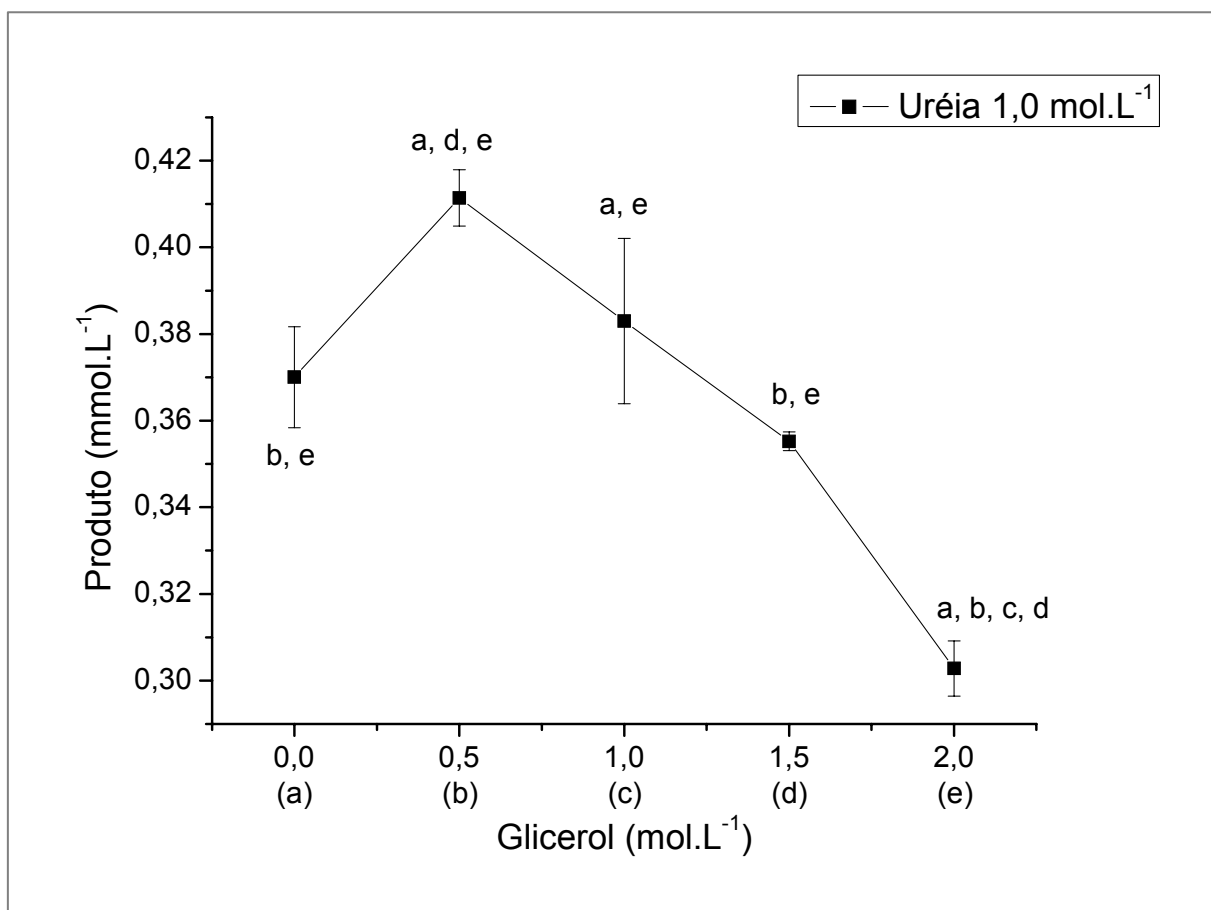


Figura 7: Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de 1,0 mol.L⁻¹ de uréia, em 40 °C e pH 5,0. As concentrações de glicerol de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 foram designadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente. As letras ao lado de cada ponto indicam que a atividade enzimática correspondente a concentração de glicerol nesse ponto é diferente daquela indicada pelas concentrações de glicerol dessas letras, conforme teste de Tukey.

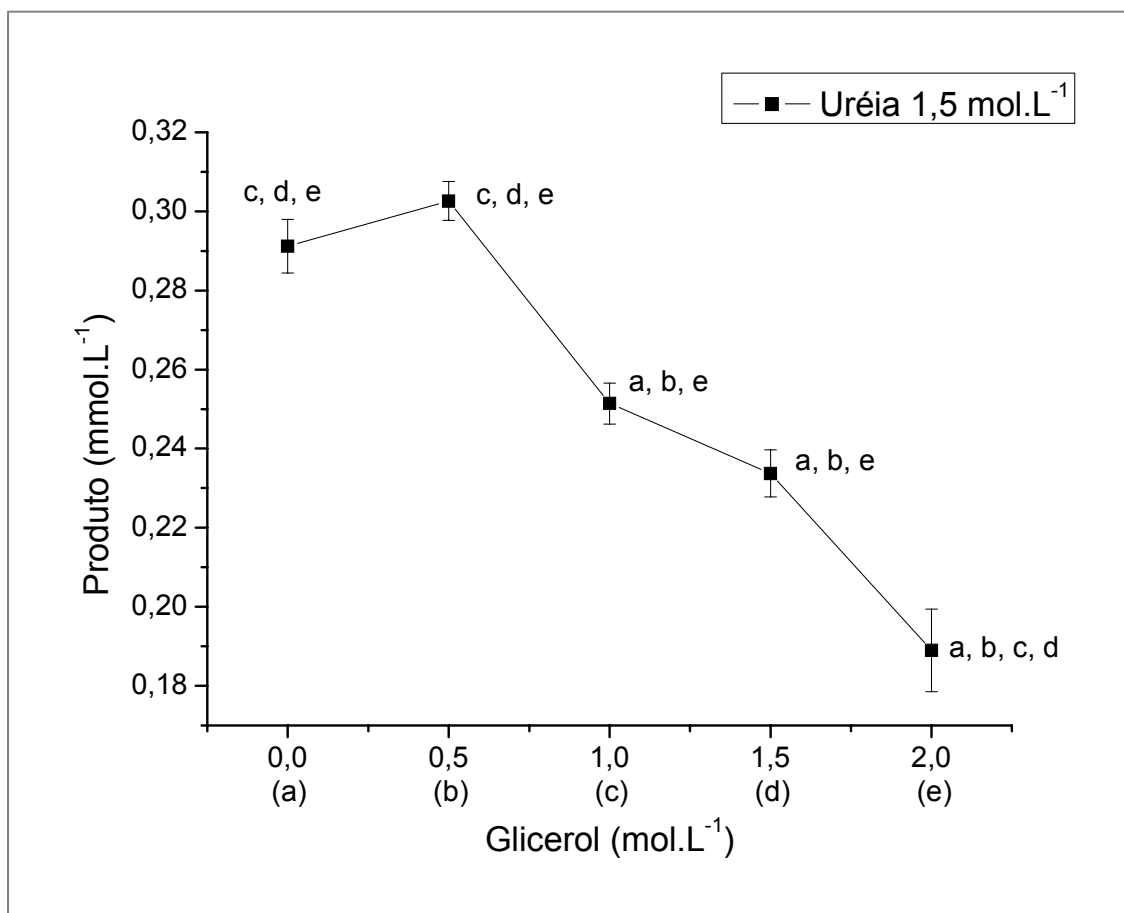


Figura 8: Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de uréia, em 40°C e pH 5,0. As concentrações de glicerol de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 foram designadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente. As letras ao lado de cada ponto indicam que a atividade enzimática correspondente a concentração de glicerol nesse ponto é diferente daquela indicada pelas concentrações de glicerol dessas letras, conforme teste de Tukey.

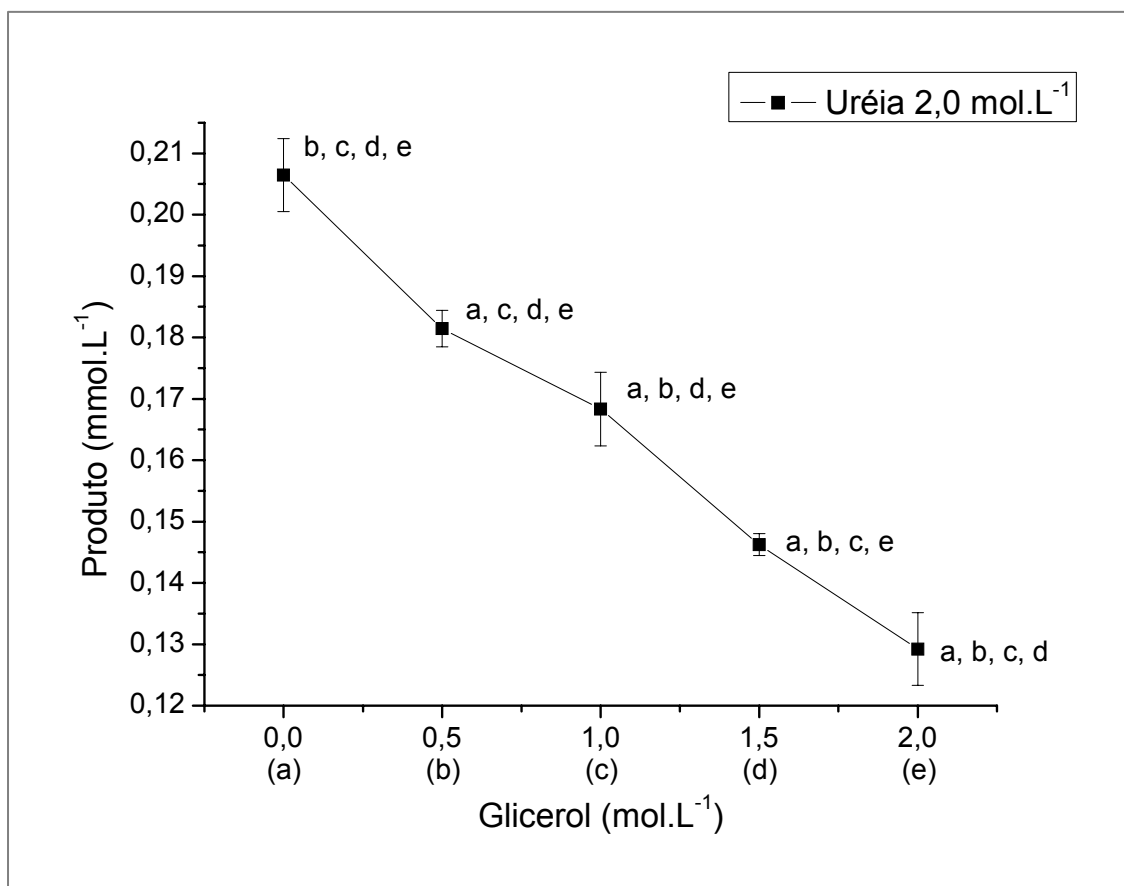


Figura 9: Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre a atividade da NAGase na presença de 2,0 mol.L⁻¹ de uréia, em 40 °C e pH 5,0. As concentrações de glicerol de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 foram designadas pelas letras a, b, c, d, e, respectivamente. As letras ao lado de cada ponto indicam que a atividade enzimática correspondente a concentração de glicerol nesse ponto é diferente daquela indicada pelas concentrações de glicerol dessas letras, conforme teste de Tukey.

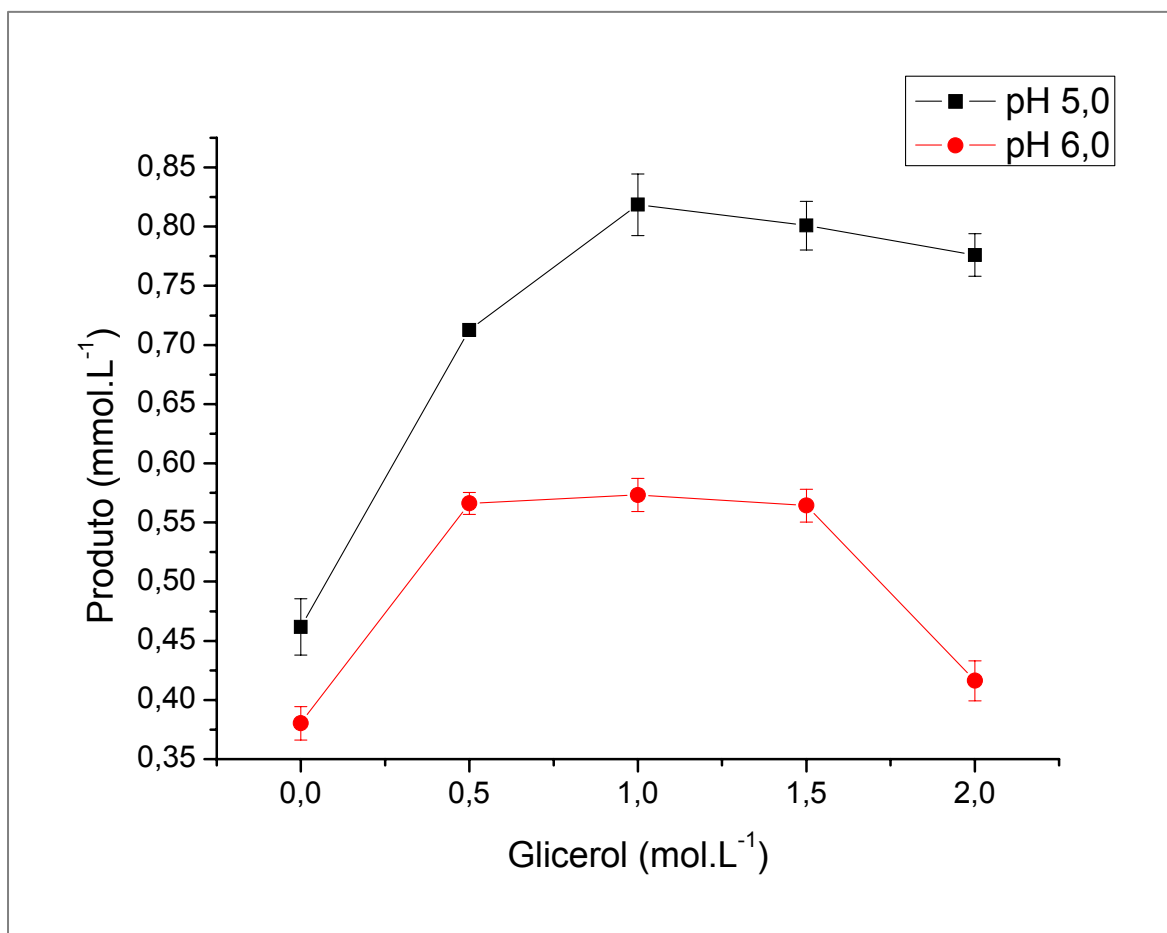


Figura 10: Efeito de concentrações crescentes de glicerol em pH 5,0 (■) e em pH 6,0 (●)

DISCUSSÃO

Efeito do glicerol em diferentes temperaturas

Uma enzima pode-se tornar inativa porque se desenovelou ou porque se tornou compacta demais (FIELDS, WHALSTRAND, SOMERO, 2001; AUTON, FERREON, BOLEN, 2006). Tradicionalmente, proteínas que se encontram nessas duas situações são consideradas pertencentes ao estado desnaturado (WANG, ROBERTSON, BOLEN, 1995; LEE, 2000; FIELDS, 2001; SOMERO, 2003; AUTON, FERREON, BOLEN, 2006). Mas para explicar melhor o efeito do glicerol, dividimos o estado desnaturado em dois: o estado compactado e o estado desenovelado. O estado compactado seria formado por microestados que correspondem a proteínas que perderam a atividade porque se tornaram compactas demais ou rígidas demais. Já o estado desenovelado seria composto por microestados correspondentes a proteínas que deixaram de ser funcionais devido a um excesso de flexibilidade da estrutura terciária da proteína. Conforme esquema apresentado na Figura 11 haveria duas situações de equilíbrio. Uma delas seria entre o estado desenovelado e o estado nativo e a outra entre o estado nativo e o estado compactado. O glicerol estaria atuando de modo distinto sobre cada um desses equilíbrios.

O glicerol favorece o dobramento de proteínas. Com isso, a cadeia polipeptídica tende a se tornar mais compacta e menos flexível (QUO, BOLEN, BOLEN, 1995). Por isso, ao atuar no equilíbrio entre o estado desenovelado e o estado nativo, o glicerol deslocaria esse equilíbrio em direção ao estado nativo. Desse modo, haveria um aumento da população de enzimas funcionais, capazes de promover a catálise. Isso então resultaria em um aumento da atividade enzimática. Pela mesma razão, por agir sobre o equilíbrio entre o estado nativo e o estado compactado, o glicerol deslocaria esse equilíbrio em direção ao estado compactado. Assim, haveria uma redução da quantidade de enzimas funcionais, o que se refletiria em uma diminuição da atividade enzimática. O glicerol agiria simultaneamente sobre cada um desses equilíbrios, mas em diferente proporção. Portanto, o glicerol poderia aumentar ou diminuir a atividade da enzima. Isso

dependeria do tipo de equilíbrio sobre o qual o glicerol estaria atuando predominantemente.

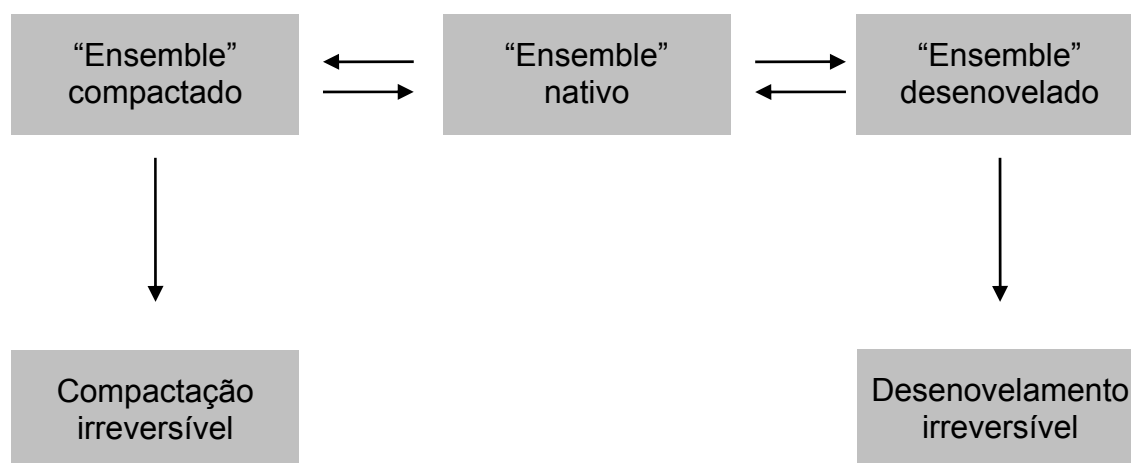


Figura 11: Esquema proposto para explicar a ação do glicerol sobre enzimas em geral. A diferença desse esquema em relação ao que já foi proposto na literatura é a inclusão do estado compactado.

Outro importante fator a ser considerado é a quantidade de enzimas que efetivamente fazem parte do equilíbrio entre os estados, pois o glicerol não tem efeito sobre enzimas que sofreram transformações irreversíveis que resultaram em desenovelamento ou compactação. Apenas as enzimas que fazem parte do equilíbrio entre os estados são sensíveis à ação do glicerol (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989, TIMASHEFF, 2002). Com base nessas considerações, poderíamos explicar o comportamento do glicerol nas diferentes situações estudadas.

Primeiramente, vejamos o que acontece em 30 °C. Nessa temperatura, a atividade da enzima é baixa, mesmo na presença de glicerol, porque a enzima possui pouca flexibilidade em decorrência da pequena agitação térmica (FIELDS, WHALSTRAND, FIELDS, 2001; SOMERO, 2004). Justamente por isso, é de se esperar que a população de enzimas que compõem o estado desenovelado seja reduzida (SOMERO, 2003). Apesar de menos numerosas, essas enzimas são mais sensíveis ao glicerol porque nelas há uma maior exposição do esqueleto peptídico (LIU, BOLEN, 1995; BOLEN, BASKAKOV, 2001). Por isso, o glicerol irá agir preferencialmente sobre as enzimas do estado desenovelado. Assim, o equilíbrio entre o estado desnaturado e o estado nativo será deslocado em direção ao estado nativo. Isso aumenta a população de enzimas do estado nativo, o que se manifesta na forma de um aumento da atividade enzimática. O efeito do glicerol ficará restrito ao estado desenovelado quando a concentração de glicerol for pequena.

Em concentrações maiores, o glicerol também atuará preferencialmente sobre as enzimas do estado desenovelado, que então farão a transição para o estado nativo. No entanto, uma vez que isso tenha acontecido, não haverá mais enzimas no estado desenovelado sensíveis à ação do glicerol. Nesse caso, por ter sido usado em concentrações maiores, o efeito do glicerol não ficará restrito ao estado desenovelado.

Tanto as enzimas do estado nativo como do estado compactado apresentam pouca exposição do esqueleto peptídico ao solvente. No entanto, essa exposição é um pouco maior nas enzimas que compõem o estado nativo. Por isso, o próximo alvo do glicerol serão as enzimas do estado nativo. Com isso,

haveria um deslocamento do equilíbrio do estado nativo em direção ao estado compactado, o que resultará em diminuição da atividade enzimática.

Portanto, em baixas concentrações o glicerol promove aumento da atividade enzimática porque atuaria preferencialmente sobre o estado desenovelado, que é deslocado em direção ao estado nativo, o que resulta em um aumento da atividade enzimática. Em concentrações maiores, o efeito do glicerol se estenderia até o estado nativo, que seria então deslocado em direção ao estado compactado, o que seria o fator responsável pela redução observada da atividade enzimática.

Com o aumento da temperatura, haveria um aumento da população de enzimas do estado nativo e do estado desenovelado, o que ocorreria à custa do estado compactado. De acordo com o esquema mostrado na Figura 11, é como se o equilíbrio entre os estados fosse deslocado da esquerda para a direita. Além disso, na medida em que a temperatura aumenta, aumentaria a quantidade de enzimas do estado desenovelado que sofrem desenovelamento irreversível (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; LEE, 2000; BOLEN, 2006). Quando isso acontece, essas enzimas deixariam de fazer parte do equilíbrio entre os estados e se tornam refratárias ao efeito do glicerol.

De 40 a 60 °C, mesmo na ausência de glicerol, haveria aumento da atividade enzimática em relação a 30 °C porque a quantidade de enzimas do estado nativo teria aumentado em detrimento do estado compactado. O aumento de atividade enzimática também é maior nesse intervalo de temperatura porque também houve um aumento da população de enzimas que compõem o estado desenovelado, pois essas enzimas podem se enovelar na presença de glicerol.

Com o aumento da concentração de glicerol, o equilíbrio entre os estados iria ser deslocado da direita para a esquerda, e o estado compactado seria repovoado à custa do estado nativo e do estado desenovelado. Isso explicaria porque, na presença de glicerol, a atividade da enzima começa a diminuir após atingir um valor máximo.

Em 70 °C, a atividade máxima da enzima na ausência de glicerol é menor do que aquela encontrada em outras temperaturas porque haveria menos enzimas que participam efetivamente do equilíbrio entre os estados. Isso aconteceria porque nessa temperatura uma quantidade considerável de enzimas

deve ter sofrido desenovelamento irreversível. No entanto, com a adição de glicerol, há um aumento de atividade que é superior àquele que ocorre em 30 °C. Acreditamos que isso tenha acontecido porque é de se esperar que o estado desenovelado em 70 °C contenha mais enzimas do que o estado desenovelado em 30 °C. Desse modo, na presença de glicerol, uma maior quantidade de moléculas da enzima faria a transição do estado desenovelado para o estado nativo em 70 °C do que em 30 °C.

Na medida em que a temperatura aumente de 50 a 70 °C, maior é a concentração de glicerol necessária para que a enzima alcance atividade máxima. Denominamos de concentração ótima de glicerol a concentração de glicerol em que isso acontece. Assim, nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C, a concentração ótima de glicerol foi estimada em 0,5, 1,0 e 1,5 mol.L⁻¹, respectivamente. Portanto, com o aumento do estresse térmico, maior é a quantidade de glicerol necessária para que a enzima adquira rigidez suficiente para que possa lidar com esse tipo de estresse.

Efeito do glicerol na presença de uréia

O glicerol tem conhecido efeito na estabilização de proteínas (GEKKO, TIMASHEFF, 1981, ARAKAWA, 1989; BOLEN, BASKAKOV, 2001, ARAKAWA, 2006, CUNHA, et al., 2007). No entanto, com o aumento da concentração de uréia, o glicerol manifesta um efeito contrário. Acreditamos que esse comportamento aparentemente anômalo do glicerol tenha uma origem semelhante ao que acontece em temperaturas elevadas, apesar do fato de que a desnaturação térmica seja diferente da desnaturação provocada pela uréia. Mas em ambos os casos, o efeito final é o desenovelamento da estrutura protéica, que resulta em perda de atividade enzimática.

A desnaturação que acontece em temperaturas elevadas é causada pelo aumento da agitação térmica da cadeia polipeptídica, o que torna a estrutura da proteína mais caótica e, por isso, mais propensa a sofrer desenovelamento (NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; SOMERO, 2003). Por outro lado, a uréia provoca desnaturação porque ela se liga diretamente à proteína (TANFORD, 1963;

TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TSAI, GERSTEIN, LEVITT, 1996; WANG, BOLEN, 1997). Essa ligação também desloca moléculas de água da camada de hidratação, o que reduz o custo energético envolvido na formação dessa camada (TASI, GERSTEIN, LEVITT, 1996). Desse modo, há uma redução da diferença de energia livre entre as proteínas do estado nativo e o estado desenovelado. Isso favorece a transição das proteínas do estado nativo para o estado desenovelado (TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 2002).

Por se ligar à proteína e se infiltrar na camada de hidratação, acreditamos que a uréia deve bloquear, pelo menos parcialmente, o acesso do glicerol à enzima. Assim, ao mesmo tempo em que a uréia promoveria o aumento da população de enzimas do estado desenovelado, ela também dificultaria a ação do glicerol sobre as enzimas desse estado. Além disso, quanto maior a quantidade de uréia ligada a uma proteína, maior será o dano causado a essa proteína.

As proteínas do estado nativo seriam justamente aquelas que ligaram uréia em menor extensão, o que não significa que essas enzimas estão menos suscetíveis ao efeito deletério da uréia. Entretanto, mesmo nessas enzimas a uréia pode deformar o sítio ativo, mas sem comprometer seriamente a capacidade da enzima de reconhecer o substrato. Além disso, a uréia também aumentaria a flexibilidade dessas enzimas, mas não o suficiente para torná-las inativas.

Acreditamos que, na presença de uréia, o glicerol atue predominantemente sobre as enzimas do estado nativo. Isso aconteceria porque as enzimas desse estado interagiriam menos com a uréia, o que significa que seriam mais acessíveis ao glicerol. No entanto, na presença de glicerol, essas enzimas se tornam mais rígidas sem que a forma do sítio ativo seja devidamente corrigida, pois o glicerol seria incapaz de remover as moléculas de uréia que perturbam essas enzimas. É possível que o glicerol torne essas enzimas tão rígidas ao ponto de deslocar o equilíbrio entre o estado nativo e o estado compactado em direção ao estado compactado.

Efeito do glicerol em pHs diferentes

Acreditamos que o glicerol aumente a atividade da enzima nos pHs analisados porque, na presença desse osmólito, o equilíbrio entre o estado nativo e o estado desenhovelado seria deslocado em direção ao estado nativo. Esse aumento de atividade foi maior em pH 5,0 do que em pH 6,0. De acordo com o nosso modelo, isso significaria que a população de enzimas do estado desenhovelado sensíveis ao efeito do glicerol seria maior em pH 5,0 do que em pH 6,0.

Na ausência de glicerol, a enzima apresentou maior atividade em pH 5,0 do que em pH 6,0. Aparentemente isso seria um indício de que em pH 6,0 uma maior quantidade de enzimas sofreu desenhovelamento. Com isso, seria de se esperar que o estado desenhovelado contivesse mais enzimas em pH 6,0 do que pH 5,0. No entanto, pode ser que muitas das enzimas que pertenceriam ao estado desenhovelado em pH 6,0 sofreram desenhovelamento irreversível, tornando-se refratárias ao efeito do glicerol. Desse modo, a quantidade de enzimas efetivamente sensíveis ao glicerol no estado desenhovelado poderia ser maior em pH 5,0 do que em pH 6,0.

De modo similar ao que ocorreu em diferentes temperaturas e em concentrações crescentes de uréia, concentrações menores de glicerol aumentam a atividade da enzima até um valor máximo, enquanto concentrações maiores diminuem a atividade da enzima a partir desse valor máximo. Conforme explicamos anteriormente, isso aconteceria porque o glicerol atua preferencialmente sobre as enzimas do estado desenhovelado. Uma vez que isso tenha acontecido, se a concentração de glicerol for suficientemente elevada, o próximo alvo do glicerol seriam as enzimas do estado nativo.

CONCLUSÕES

Concentrações de glicerol entre 0,5 e 1,0 mol.L⁻¹ promovem aumento da atividade da NAGase até um valor máximo, mas entre 1,5 e 2,0 mol.L⁻¹ tem-se um gradual declínio da atividade da enzima. Isso acontece na presença de diversos fatores que podem causar a desnaturação de uma proteína, como temperaturas elevadas (60 e 70 °C), soluções de uréia e pH diferente do pH ótimo da enzima.

O efeito do glicerol depende da sua concentração. Em concentrações menores o glicerol atuaria predominantemente sobre o estado desenovelado, por causa da maior exposição do esqueleto peptídico das enzimas que compõem esse estado. Isso resultaria em um deslocamento do equilíbrio do estado desenovelado para o estado nativo, cuja população de enzimas seria então aumentada. Esse deslocamento de equilíbrio seria responsável pelo aumento observado na atividade enzimática. Em concentrações maiores, o glicerol atuaria predominantemente sobre o estado nativo, deslocando-o em direção ao estado compactado. Com isso haveria uma diminuição da população de enzimas do estado nativo, o que seria o fator responsável pela redução observada na atividade enzimática.

O aumento de atividade promovido pelo glicerol depende da população de enzimas do estado desenovelado sensível a esse osmólito. Com o aumento da temperatura e da concentração de uréia há um deslocamento do equilíbrio do estado nativo para o estado desenovelado. Entretanto, em temperaturas muito altas parte das enzimas que compunham o estado desenovelado sofre desnaturação irreversível e por isso deixa de ser sensível à ação do glicerol.

Com o aumento da concentração de uréia o glicerol vai gradualmente perdendo efeito até chegar a um ponto em que se torna prejudicial para a atividade da enzima, de modo que a atividade da enzima é menor em uma solução de uréia e glicerol do que uma solução que contenha apenas uréia. Isso acontece porque o glicerol estabilizaria enzimas que tenham sítio ativo com geometria deformada, mas que ainda conseguem promover alguma catálise porque possuem certa flexibilidade. Ao estabilizar essas macromoléculas, o glicerol as tornaria rígidas demais, o que seria a razão pela qual haveria diminuição da atividade enzimática.

Resumindo, temos que o efeito do glicerol depende dos seguintes fatores:

- Natureza do estresse desnaturante;
- Intensidade do estresse desnaturante;
- Concentração de glicerol;
- Quantidade relativa de enzimas em cada estado;
- População de moléculas da enzima que efetivamente participam do equilíbrio entre os estados e que por isso seriam sensíveis ao glicerol.

REFERÊNCIAS

- ARAKAWA, T.; EJIMA, D.; KITA, Y.; TSUMOTO, K. Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1677-1687, 2006.
- AUTON, M.; FERREON, A. C. M.; BOLEN, D. W. Metrics that differentiate the origins of osmolyte effects on protein stability: a test of the surface tension proposal. **Journal of Molecular Biology**, v. 361, p. 983-992, 2006.
- BOLEN, D. W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. **Methods**. v. 34, p. 312-322, 2004.
- BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**. v. 310, p. 955-963, 2001.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, engineering, and design of protein structures. In: _____. **Introduction to Protein Structure**. Nova York e Londres: Garland Publishing, 1991. p. 247-266.
- CUNHA, C.C; ARVELOS, L. R.; COSTA, J. O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.
- ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v. 19, p. 709-714, 2000
- FIELDS, P. A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 129, p. 417-431, 2001.
- FIELDS, P. A.; SOMERO, G. N. Hot spot in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antarctic notothenioids fishes. **PNAS**, v. 95, p. 11476-11481, 1998.

FIELDS, P. A.; WAHLSTRAND, B. D.; SOMERO, G. N. Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes. **European Journal of Biochemistry.**, v. 268, p. 4497-4505, 2001.

FONSECA, L. C.; CORRÊA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

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.

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.

LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; TRONSMO, A.; WOO, S. L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopatology**, v. 83, n. 3, p. 302-307, 1993.

MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUZA, M. V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 383, 386, 2000.

MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by *Trichoderma*

harzianum strain which controls *Crinipellis perniciosus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 70-75, 2004.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 119-123, 2000.

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

PARHAM, J. A.; DENG, S. P. Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1183-1190, 2000.

QUO, Y. Y.; BOLEN, C. L.; BOLEN, D. W. Osmolite-driven contraction of a random coil protein. **PNAS**. 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. **Biochemical Journal**. v. 329, p. 137-143, 1998.

SILVA, R. N.; SILVA, S. P.; BRANDÃO, R. L.; ULHOA, C. J. Regulation of N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. **Research in Microbiology**. v. 155, p. 667-671, 2004.

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

SOMERO, G. N. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 321-333, 2004.

TANFORD, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. **Journal of American Chemistry. Society**. v. 84, p. 4240-4247, 1962.

TANFORD, C. Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions. **Journal of American Chemistry. Society.** v. 86, p. 2050-2059, 1963.

TAYLOR, L. S.; YORK, P.; WILLIAMS, A. C.; EDWARDS, H. G. M.; MEHTA, V.; JACKSON, G. S.; BADCOE, I. G.; CLARKE, A. R. Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1253, p. 39-46, 1995.

TIMASHEFF, S. N. Solvent effects on protein stability. **Current Opinion in Structural Biology.** v. 2, p. 35-39, 1992.

TIMASHEFF, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **PNAS**, v. 99, p. 9721-9726, 2002.

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

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

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and characterization of an extracellular chitinase from *Trichoderma harzianum*. **Current Microbiology**, v. 23, p. 285-289, 1991.

VIANA, Y. A.; GARROTE-FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 83-88, 2005.

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. **Science Progress**, v. 87, p. 1-24, 2004.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with whater stress: evolution of osmolyte system. **Science**. v. 217, p. 1214-1222, 1982.