

## EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL, SACAROSE, SARCOSINA E SORBITOL SOBRE A EXTINÇÃO MOLAR EM 281,5 nm DE N-ACETIL-D,L-TRIPTOFANO ETIL ÉSTER E N-ACETIL-D,L-TIROSINA ETIL ÉSTER

*EFFECT OF THE CONCENTRATION OF GLICEROL, SUCROSE, SARCOSINE, AND SORBITOL, ON THE MOLAR EXTINCTION OF N-ACETYL-D,L-TRYPTOPHAN ETHYL ESTER AND N-ACETYL-D,L-TYROSINE ETYL ESTER AT 281,5 nm*

*Nadia Rubia FERREIRA<sup>1</sup>; Gisele VISSOC<sup>2</sup>; Nilson PENHA-SILVA<sup>3</sup>*

**RESUMO:** As propriedades dos osmólitos têm sido cada vez mais utilizadas em biologia molecular e biotecnologia, especialmente para a manutenção da atividade biológica de preparações purificadas de proteínas. Eles representam uma importante condição estabilizante não somente para as proteínas e ácidos nucleicos, mas também para células, tecidos e órgãos. Glicerol, sacarose, sarcosina e sorbitol são pequenos solutos orgânicos de diferentes classes de osmólitos. O presente trabalho estuda o efeito de concentrações crescentes de tais osmólitos sobre a extinção molar em 281,5 nm de N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster (N-Ac-Trp-EE) e N-Acetil-D,L-Tirosina-Etil Éster (N-Ac-Tyr-EE), de maneira a avaliar a resposta física dos grupos triptofanil e tirosinil de proteínas à mesma alteração na composição do solvente. Os coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) foram determinados de acordo com a lei de Lambert-Beer,  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , a partir dos valores de absorvância ( $A$ ) de cada cromóforo em 281,5 nm, usando concentrações ( $c$ ) de 0,001 e 0,005 mol.L<sup>-1</sup> para N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE, respectivamente, em uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico ( $l$ ). A extinção molar em 281,5 nm de N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE não foi significativamente perturbada pelo aumento da concentração molar de glicerol (de 0 a 4 mol.L<sup>-1</sup>), sacarose (de 0 a 1,5 mol.L<sup>-1</sup>), sarcosina (de 0 a 1 mol.L<sup>-1</sup>), e sorbitol (de 0 a 2 mol.L<sup>-1</sup>).

**UNITERMOS:** Osmólitos, N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster, N-Acetil-D,L-Tirosina Etil Éster, Extinção molar.

### INTRODUÇÃO

As propriedades dos osmólitos estão se tornando cada vez mais úteis em biologia molecular e em biotecnologia, especialmente na manutenção da atividade biológica de preparações purificadas de proteínas. Os osmólitos representam uma importante condição estabilizante não somente para as proteínas e ácidos nucleicos, mas também para células, tecidos e órgãos (FELIX et al., 1999; PANEK, 1996; SOLA-PENNA; MEYER-FERNANDES, 1998).

Muitos microrganismos, peixes, plantas e animais submetidos a situações de estresse ambiental são capazes de preservar suas atividades biológicas pela conservação

de suas proteínas no estado nativo. Estes organismos têm adaptado uma estratégia comum na proteção de suas proteínas celulares contra estes estresses ambientais (BOROWITZKA, 1985; YANCEY et al., 1982). Esta estratégia envolve o acúmulo de compostos orgânicos de baixo peso molecular, coletivamente chamados osmólitos, produzidos por células de todos os organismos em geral, exceto as halobactérias, em concentrações intracelulares que vão de apenas algumas dezenas a centenas de milimolar (CLARK, 1985; BROWN; SIMPSON, 1972; RHODES, 1987; SOMERO, 1986a; SOMERO, 1986b; YANCEY et al., 1982).

Os osmólitos são quimicamente classificados em três grandes grupos (YANCEY et al., 1982). Os álcoois

<sup>1</sup> Pós-Graduada em Genética e Bioquímica, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>2</sup> Médica graduada pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>3</sup> Professor titular, Instituto de Genética e Bioquímica; Universidade Federal de Uberlândia.

Received 10/12/03 Accept 26/02/04

poliidroxílicos, como o glicerol e o sorbitol constituem o primeiro grupo. O segundo grupo é constituído pelos aminoácidos e seus derivados, compreendendo a glicina, a metilglicina (ou sarcosina), a dimetil-glicina e a trimetil-glicina (ou betaína), por exemplo. O terceiro grupo de osmólitos compreende os açúcares, como a sacarose e a trealose.

Estes osmólitos são ainda classificados como solutos compatíveis ou solutos neutralizantes, com base em seus efeitos na atividade funcional de proteínas (BOROWITZKA; BROWN, 1974; BROWN; SIMPSON, 1972; YANCEY et al., 1982).

Os osmólitos compatíveis, compreendendo certos aminoácidos neutros livres e carboidratos, são aqueles que podem estar presentes em altas e variadas concentrações sem perturbar a atividade funcional protéica próximo à temperatura ambiente (BOROWITZKA; BROWN, 1974; BOWLUS; SOMERO, 1979; WANG; BOLEN, 1997).

Os osmólitos neutralizantes incluem espécies como a glicerofosforilcolina e a betaína (LIEN; PACELLI; BRAUN, 1993; PETERSON et al., 1992; YANCEY; BURG, 1990), que são formadas pelos organismos para lidar com o efeito deletério de solutos como a uréia sobre a estabilidade e atividade funcional das proteínas (BASKAKOV; WANG; BOLEN, 1998; LIN; TIMASHEFF, 1994; YANCEY; SOMERO, 1979).

Um grande número de dados sugere que ambos, osmólitos compatíveis e neutralizantes aumentam a estabilidade térmica das proteínas (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985; PLAZA DEL PINO; SANCHEZ-RUIZ, 1995; SANTORO et al., 1992; TANEJA, AHMAD, 1994; TIMASHEFF, 1992; YANCEY et al., 1982). O principal fator responsável por este efeito estabilizante está relacionado com o fato destes osmólitos serem excluídos preferencialmente do domínio protéico proporcionando a hidratação preferencial da proteína. (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1983; ARAKAWA; TIMASHEFF, 1985; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992). Este efeito deve favorecer o estado protéico com a menor superfície exposta, de tal modo a deslocar o equilíbrio de desnaturação entre os estados nativo (N) e desnaturado (D) de uma proteína no sentido do estado N. Ou seja, os osmólitos desestabilizam o nível de energia livre no estado desnaturado de uma proteína muito mais do que desestabilizam o nível de energia livre no estado nativo, dessa forma tornando a desnaturação mais desfavorável na presença do osmólito do que em sua ausência, não através de interação direta com proteínas, mas por sua exclusão preferencial da água da vizinhança da proteína (ARAKAWA; BHAT; TIMASHEFF, 1990; LEE; TIMASHEFF, 1981).

As cadeias laterais de tirosina e triptofano têm grande capacidade de absorver a radiação luminosa na região ultravioleta do espectro (BRAY; CARRIERE; CLARKE, 1994; EDELHOCH, 1967; MACH; MIDDAUGH; LEWIS, 1992). Este comportamento espectral têm sido muito utilizado em estudos do efeito de solutos caotrópicos sobre a estabilidade protéica, inclusive no laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia (BRITO et al., 2003). A utilização dos valores de  $\epsilon_{\text{máx}}$  da tirosina e triptofano como método de estudo do efeito de solutos estabilizantes pode ser feita numa base mais segura se o comportamento espectral daquelas cadeias laterais não sofrer alterações significantes em função da incorporação de solutos estabilizantes no solvente.

A ocorrência de perturbação no espectro de absorção ultravioleta de tirosina e triptofano pode ser estudada utilizando cromóforos que contenham as cadeias daqueles aminoácidos sem apresentar a complexidade conformacional da proteína. O N-Ac-Tyr-EE e o N-Ac-Trp-EE são compostos usados como substratos para avaliação da atividade de enzimas da família da quimotripsina, que apresenta especificidade de ligação pelas cadeias laterais de tirosina e triptofano. Aqueles compostos representam uma alternativa interessante para se pesquisar o efeito dos osmólitos sobre o comportamento espectral das cadeias laterais de tirosina e triptofano.

Este trabalho procura explorar esta questão, utilizando osmólitos da classe dos álcoois poliidroxílicos (glicerol e sorbitol), dos aminoácidos e metilaminas (sarcosina), e dos açúcares (sacarose). Como o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) varia com o comprimento de onda, foi utilizado um comprimento de onda fixo de 281,5 nm.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Equipamento

As medidas de massa foram feitas em uma balança analítica da marca Sartorius ou em uma balança digital de precisão da marca Kern, modelo 870. As medidas de densidade óptica utilizaram um espectrofotômetro de feixe único da marca Zeiss, modelo Spekol UV-VIS, com cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Durante a preparação e posterior utilização das soluções, foram utilizadas pipetas das marcas Herka e Pyrex; beakers, provetas e balões volumétricos da marca Pyrex; além de pipetas automáticas reguláveis Labsystems modelo Finnpipette Digital (0,5  $\mu\text{L}$  a 10  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  a 40  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{L}$  a 200  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  a 1000  $\mu\text{L}$ ).

## Reagentes

O N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster (N-Ac-Trp-EE) e o N-Acetil-D,L-Tirosina Etil Éster (N-Ac-Tyr-EE) foram adquiridos da Sigma Chemical Company e manipulados como adquiridos, sem posteriores purificações.

Como osmólitos foram utilizados sacarose, glicerol, sorbitol e sarcosina, cujos pesos moleculares são, respectivamente, de 342,3, 92,1, 18,17 e 125,6. Todos com grau de pureza de pelo menos 99,5%. A sacarose, o glicerol e a sarcosina foram provenientes da Sigma Chemical Company, e o sorbitol foi adquirido da Nuclear, todos manipulados como adquiridos, sem posteriores purificações.

O solvente foi preparado com KCl PA, cujo peso molecular é de 74,56, com 99,5% de pureza, adquirido da Cinética Química LTDA.

As soluções de osmólitos foram preparadas diariamente em KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e suas concentrações foram consideradas com base nas massas medidas de cada composto.

## Efeito de osmólitos sobre as propriedades espectrais de N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE

O efeito de concentrações crescentes de osmólitos sobre a extinção de luz ultravioleta por N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE foi estudado em comprimento de onda fixo de 281,5 nm, com a utilização de um espectrofotômetro Spekol, por espectroscopia de diferença. O padrão de dependência de  $\epsilon_{281,5}$  dos cromóforos com a concentração de cada osmólito foi utilizado para pesquisar efeitos estruturais dos osmólitos sobre os cromóforos.

Em um experimento típico, era colocado 1 mL de KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> nas cubetas designadas como R, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, quando a leitura de absorvância do espectrofotômetro era zerada. A partir deste momento, era feita uma única adição de 0,20 mL da solução de N-Ac-Trp-EE a 1 mmol.L<sup>-1</sup> ou N-Ac-Tyr-EE a 5 mmol.L<sup>-1</sup> na cubeta S<sub>2</sub> e de 0,20 mL de KCl a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> nas cubetas R e S<sub>1</sub>. Em seguida, eram feitas várias adições de 0,20 mL da solução de cada osmólito nas cubetas S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, e após agitação eram feitas as leituras da absorvância de S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> contra a cubeta R. Para permitir que a variação de volume na cubeta de referência acompanhasse a variação de volume das cubetas S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, para cada adição da solução do osmólito também se fazia uma adição de KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> na cubeta de referência. As leituras obtidas em S<sub>2</sub> eram subtraídas das leituras obtidas em S<sub>1</sub>, e o resultado era multiplicado pelo fator de diluição da amostra, obtido pela divisão do volume final pelo volume inicial. Os experimentos foram repetidos várias vezes, até obtenção de um número mínimo de quatro séries coincidentes.

## Cálculo do coeficiente de extinção molar de N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE

Os coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) de N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE foram determinados de acordo com a Lei de Lambert-Beer, que correlaciona a densidade óptica da solução (absorvância) com o seu coeficiente de extinção molar através da equação  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , onde  $A$  indica a leitura de absorvância de cada cromóforo em 281,5 nm;  $c$  é a concentração do cromóforo, que foi de 0,001 e 0,005 mol.L<sup>-1</sup> para N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE, respectivamente, a fim de propiciar valores de absorvância de no máximo 1 em 281,5 nm; e  $l$  é o caminho percorrido pelo feixe de luz durante a leitura em uma cubeta de quartzo, cuja magnitude foi de 1 cm. Todos os gráficos foram editados com o programa Origin 6.0 da Microcal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados foi feita pela observação da dependência dos valores do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{281,5}$ ) de N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE com a concentração dos osmólitos. Os valores calculados dos coeficientes de extinção molar em 281,5 nm para o efeito de cada osmólito sobre cada cromóforo foram locados em um único gráfico, a fim de permitir uma visualização do grau de dispersão das medidas experimentais.

Estes resultados estão mostrados nas Figuras de 1 a 4. A Figura 1 mostra os efeitos do glicerol sobre os valores de  $\epsilon_{281,5}$  do N-Ac-Trp-EE e do N-Ac-Tyr-EE. Os efeitos da sacarose sobre os valores de  $\epsilon_{281,5}$  do N-Ac-Trp-EE e do N-Ac-Tyr-EE, estão mostrados na Figura 2. A Figura 3 mostra os efeitos da sarcosina sobre os valores de  $\epsilon_{281,5}$  do N-Ac-Trp-EE e do N-Ac-Tyr-EE. Os efeitos do sorbitol foram estudados somente sobre os valores de  $\epsilon_{281,5}$  do N-Ac-Trp-EE (Figura 4).

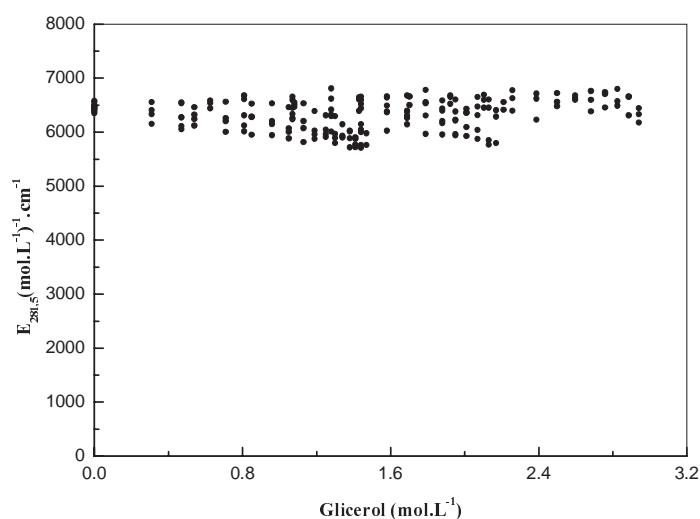
Como pode ser observado em todas as situações estudadas, os coeficientes de extinção molar do N-Ac-Trp-EE e do N-Ac-Tyr-EE não foram significativamente perturbados pelas concentrações crescentes de glicerol, sacarose, sarcosina e sorbitol em amplas faixas de concentração dos osmólitos. Entretanto, em alguns casos, a extinção molar começa a declinar depois de certos valores de concentração de alguns osmólitos. Para o N-Ac-Trp-EE, a sacarose (Figura 2-A) e sarcosina (Figura 3-A) causam de fato declínios na extinção molar da luz em concentrações acima de 1,25 e 0,6 mol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para o N-Ac-Tyr-EE, ocorrem declínios na extinção molar da luz em concentrações acima de 3,5 e 0,7 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol (Figura 1-B) e sacarose (Figura 2-B), respectivamente. Como tais declínios ocorrem em

valores de concentração mais elevados dos solutos, é possível que eles sejam resultantes de precipitação dos cromóforos.

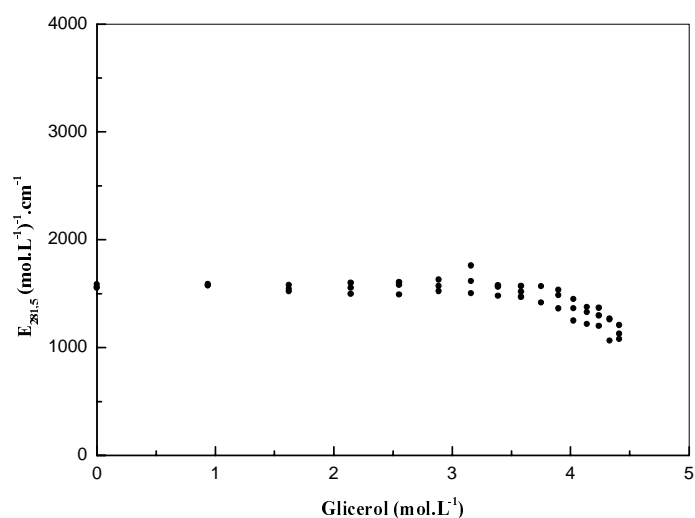
Os valores determinados para os coeficientes de extinção molar do N-Ac-Trp-EE e do N-Ac-Tyr-EE são concordantes com valores reportados na literatura. Os coeficientes de extinção molar do N-Ac-Trp-EE e do N-Ac-Tyr-EE em 280 nm são da ordem de  $5500 \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e  $1500 \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , respectivamente (BRAY; CARRIERE; CLARKE, 1994; BRITO et al., 2003; EDELHOCH, 1967; MACH; MIDDAUGH; LEWIS, 1992; PACE et al., 1995).

A pequena dispersão observada nos valores calculados do  $\epsilon_{281,5}$  de N-Ac-Trp-EE e N-Ac-Tyr-EE em amplas faixas de concentração dos osmólitos indica que os osmólitos glicerol, sacarose, sarcosina e sorbitol não afetam os valores da extinção molar dos grupamentos cromóforos também presentes nas estruturas das proteínas. Estes resultados são bastante significativos e indicam que a espectrofotometria no ultravioleta pode ser usada para avaliar possíveis efeitos dos osmólitos sobre a conformação de proteínas, em concordância com relatos já presentes na literatura (VILLANUEVA; HERSKOVITS, 1971).

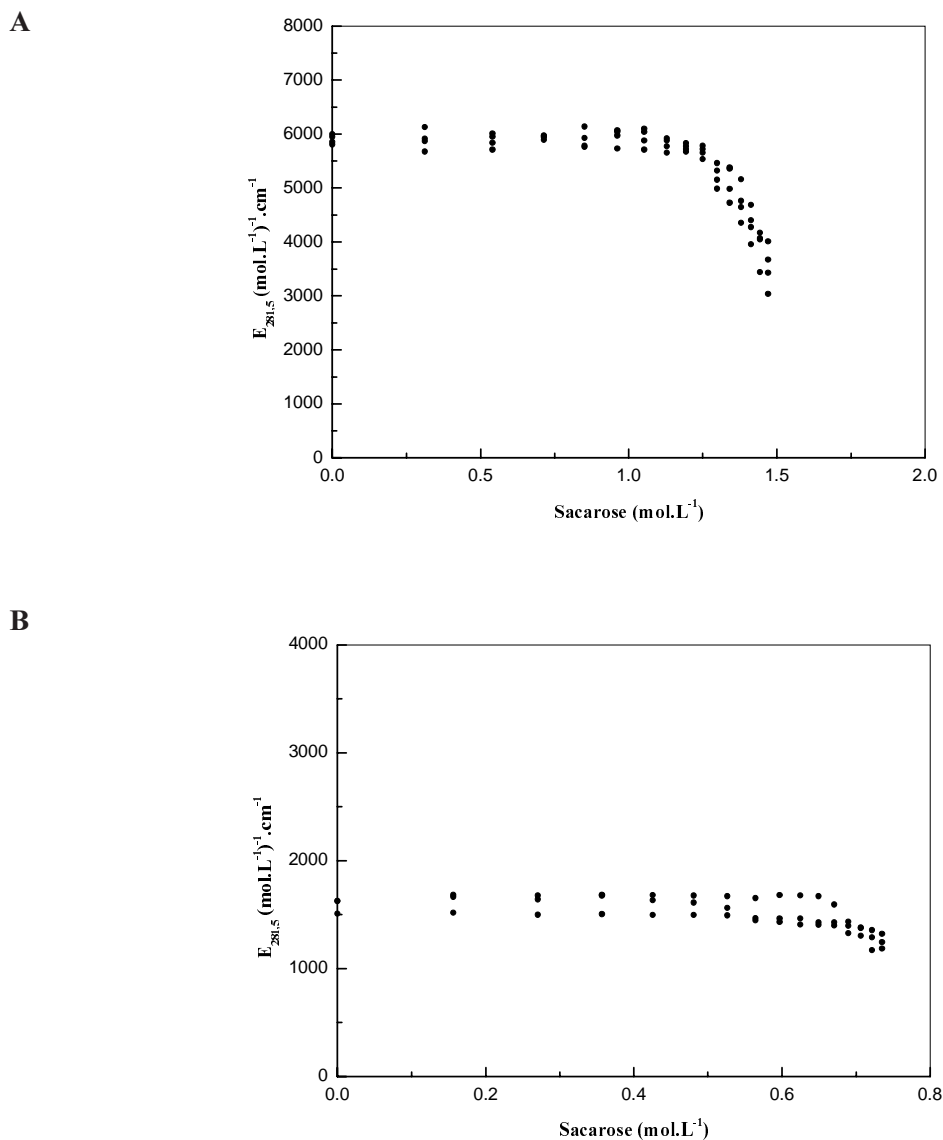
A



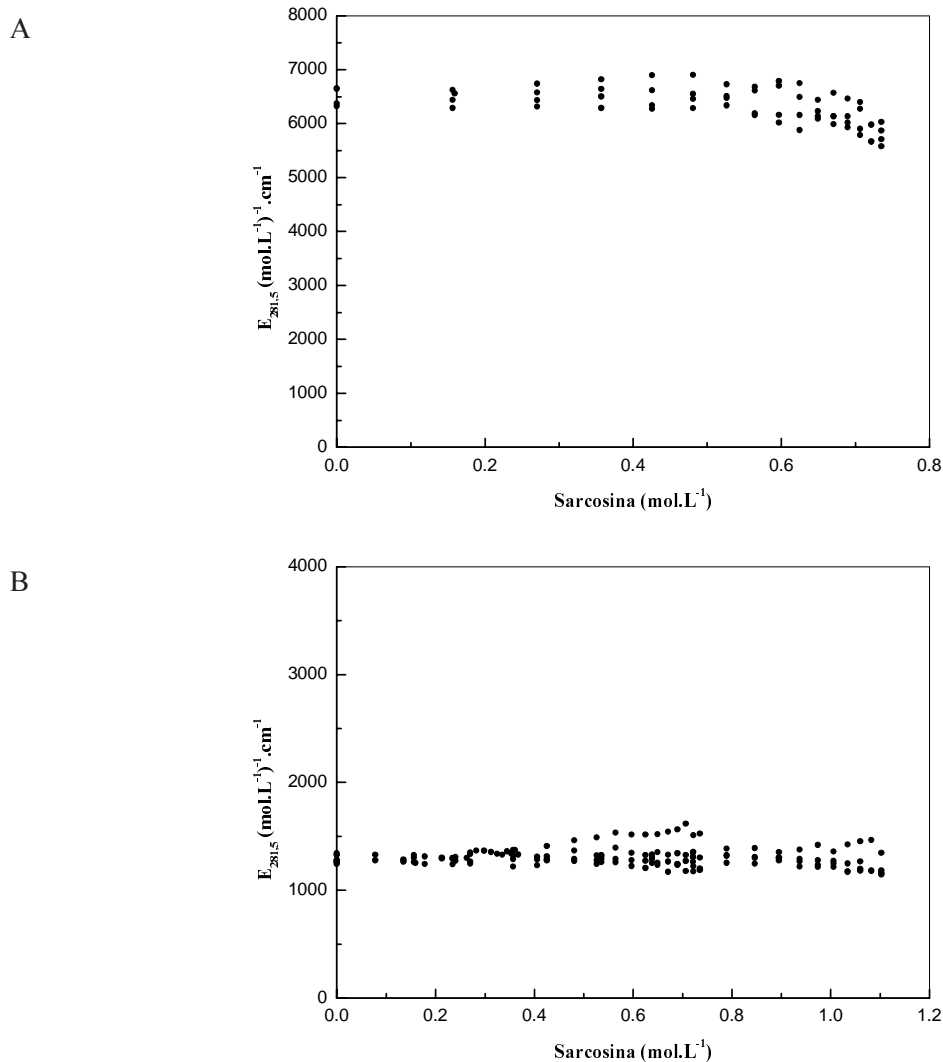
B



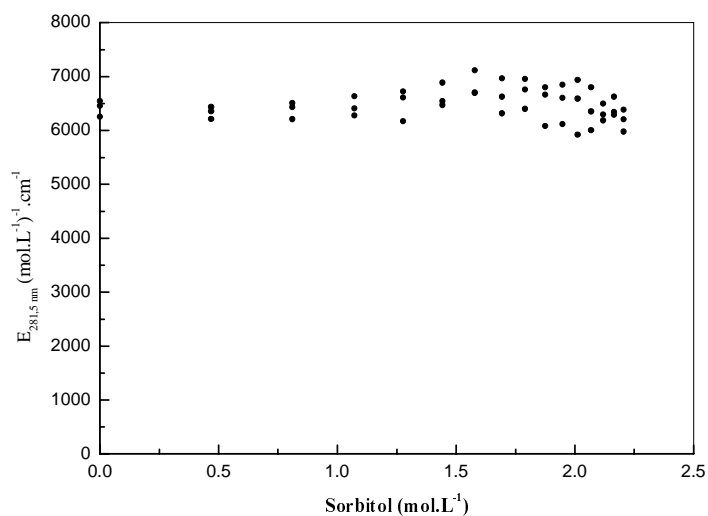
**Figura 1.** Efeito de concentrações crescentes de glicerol sobre o coeficiente de extinção molar de N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster (A) e de N-Acetil-D,L-Tirosina Etil Éster (B) em 281,5 nm.



**Figura 2.** Efeito de concentrações crescentes de sacarose sobre o coeficiente de extinção molar de N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster (A) e de N-Acetil-D,L-Tirosina Etil Éster (B) em 281,5 nm.



**Figura 3.** Efeito de concentrações crescentes de sarcosina sobre o coeficiente de extinção molar de N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster (A) e de N-Acetil-D,L-Tirosina Etil Éster (B) em 281,5 nm.



**Figura 4.** Efeito de concentrações crescentes de sorbitol sobre o coeficiente de extinção molar de N-Acetil-D,L-Triptofano Etil Éster em 281,5 nm.

## CONCLUSÕES

O coeficiente de extinção molar do N-Ac-Trp-EE não foi perturbado por aumentos na concentração de até 3,0 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol, 1,25 mol.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6 mol.L<sup>-1</sup> de sarcosina, e 2,2 mol.L<sup>-1</sup> de sorbitol.

O coeficiente de extinção molar do N-Ac-Tyr-EE não foi perturbado por aumentos na concentração de até 3,5 mol.L<sup>-1</sup> de glicerol, 0,7 mol.L<sup>-1</sup> de sacarose, e 1,1 mol.L<sup>-1</sup> de sarcosina.

## AGRADECIMENTOS

Os autores do presente trabalho agradecem o apoio financeiro das seguintes instituições: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES); Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (PROPP-UFU); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

---

**ABSTRACT:** Properties of osmolytes are becoming increasingly used in molecular biology and biotechnology, especially to maintain biological activities of purified preparations of proteins. They represent an important stabilizing condition not only for proteins and nucleic acids, but also for cells, tissues, and organs. Glycerol, sucrose, sarcosine, and sorbitol are small organic solutes from different classes of osmolytes. The present work studies the effect of increasing concentrations of such osmolytes on the molar extinction of UV light at 281.5 nm by N-Acetyl-D,L-Tryptophane Ethyl Ester (N-Ac-Trp-EE) and N-Acetyl-D,L-Tyrosine Ethyl Ester (N-Ac-Tyr-EE), in order to evaluate the physical response of tryptophanyl and tyrosinyl groups of proteins to the same solvent conditions. The molar extinction coefficients ( $\epsilon$ ) were determined according to the Lambert-Beer equation,  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ , from the absorbance values ( $A$ ) of each chromophore at 281,5 nm, by using concentrations ( $c$ ) of 0.001 and 0.005 mol.L<sup>-1</sup> for N-Ac-Trp-EE and N-Ac-Tyr-EE, respectively, in a quartz measuring cell with 1 cm ( $l$ ) of optical path. Molar extinction of UV light at 281, 5 nm by N-Ac-Trp-EE and N-Ac-Tyr-EE were not significantly disturbed by the increase in the molar concentration of glycerol (from 0 to 4 mol.L<sup>-1</sup>), sucrose (from 0 to 1.5 mol.L<sup>-1</sup>), sarcosine (from 0 to 1 mol.L<sup>-1</sup>), and sorbitol (from 0 to 2 mol.L<sup>-1</sup>).

**UNITERMS:** Osmolytes, N-Acetyl-D,L-Tryptophane Ethyl Ester, N-Acetyl-D,L-Tyrosine Ethyl Ester, Molar extinction.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 224, n. 1, p. 169-177, jul. 1983.

\_\_\_\_\_. The stabilization of proteins by osmolytes. **Biophysical Journal**, Bethesda, v. 47, n. 3, p. 411-414, mar. 1985.

ARAKAWA, T.; BHAT, R.; TIMASHEFF, S. N. Preferential interactions determine protein solubility in three-component solutions: the MgCl<sub>2</sub> system. **Biochemistry**, Washington, v. 29, n. 7, p. 1914-1923, feb. 1990.

BASKAKOV, I.; WANG, A.; BOLEN, D. W. Trimethyl-N-oxide counteracts urea effects on rabbit muscle lactate dehydrogenase function: a test of the counteraction hypothesis. **Biophysical Journal**, Bethesda, v. 74, n. 5, p. 2666-2673, may 1998.

BOROWITZKA, L. J. Glycerol and other carbohydrate osmotic effector. In: GILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. (Ed.). **Transport processes, iono- and osmoregulation**. Berlin: Springer Verlag, 1985. p. 437-453.

BOROWITZKA, L. J.; BROWN, A. D. The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga, *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. **Archives of Microbiology**, New York, v. 96, n. 1, p. 37-52, mar. 1974.

BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 208, n. 2, p. 137-151, may 1979.

BRAY, M.R.; CARRIERE, A.D.; CLARKE, A.J. Quantitation of tryptophan and tyrosine residues in proteins by fourth-derivative spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 221, n. 2, p. 278-284, sep. 1994.

BRITO, A. G.; SOARES, A. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; BORGES, M. H.; GIGLIO, J. R.; PENHA-SILVA, N. Spectroscopic analysis of the stability of *Bothrops* myotoxic phospholipases A2 to guanidine and urea denaturation. **Protein and Peptide Letters**, Schiphol, v. 10, n. 1, p. 85-94, feb. 2003.

BROWN, A. D.; SIMPSON, J. R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. **Journal of Genetics and Microbiology**, Reading, v. 72, n. 3, p. 589-591, oct. 1972.

CLARK, M. E. The osmotic role of amino acids: discovery and function. In: GILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. (Ed.). **Transport processes, ionic- and osmoregulation**. Berlin: Springer Verlag, 1985. p. 412-423.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, Washington, v. 6, n. 7, p. 1948-1954, jul. 1967.

FELIX, C. F.; MOREIRA, C. C.; OLIVEIRA, M. S.; SOLA-PENNA, M.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SCOFANO, H. M.; FERREIRA-PEREIRA, A. Protection against thermal denaturation by trehalose on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from yeast. Synergetic effect between trehalose and phospholipid environment. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 266, n. 2, p. 660-664, dec. 1999.

LEE, J. C.; TIMASHEFF, S. N. The stabilization of proteins by sucrose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 256, n. 14, p. 7193-7201, jul. 1981.

LIEN, Y. H.; PACELLI, M. M.; BRAUN, E. J. Characterization of organic osmolytes in avian renal medulla: a nonurea osmotic gradient system. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 264, n. 6, p. R1045-R1049, jun. 1993.

LIN, T. Y.; TIMASHEFF, S. N. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. **Biochemistry**, Washington, v. 33, n. 42, p. 12695-12701, oct. 1994.

MACH, H.; MIDDAGH, C. R.; LEWIS, R. V. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 200, n. 1, p. 74-80, jan. 1992.

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, West Lafayette, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, nov. 1995.

PANEK, A. D. Trehalose metabolism – new horizons in technological applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 169-181, feb. 1995.

PETERSON, D. P.; MURPHY, K. M.; URSINO, R.; STREETER, K.; YANCEY, P. H. Effects of dietary protein and salt on rat renal osmolytes: covariation in urea and GPC contents. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 263, n. 4, p. F594-F600, oct. 1992.



PLAZA DEL PINO, I. M.; SANCHEZ-RUIZ, J. M. An osmolyte effect on the heat capacity change for protein folding. **Biochemistry**, Washington, v. 34, n. 27, p. 8621-8630, jul. 1995.

RHODES, D. Metabolic responses to stress. In: DAVIES, D. D. (Ed.). **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic, 1987. p. 201-241.

SANTORO, M. M.; LIU, Y.; KHAN, S. M. A.; HOU, S.-X.; BOLEN, D. W. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 23, p. 5278-5283, jun. 1992.

SOLA-PENNA, M.; MEYER-FERNANDES, J. R. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, n. 1, p. 10-14, dec. 1998.

SOMERO, G. N. Intracellular pH, buffering substances, and proteins: imidazole protonation and the conservation of protein structure and function. In: GILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. (Ed.). **Transport processes, iono- and osmoregulation**. Berlin: Springer Verlag, 1986a. p. 454-468.

\_\_\_\_\_. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 251, n. 2, p. R197-R213, aug. 1986b.

TANEJA, S.; AHMAD, F. Increased thermal stability of proteins in presence of amino acids. **Biochemical Journal**, Portland, v. 303, n. 1, p. 147-153, oct. 1994.

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

TIMASHEFF, S. N. The physicochemical basis for the selection of osmolytes by nature. In: SOMERO, G.N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Ed.). **Water and life: a comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular, and molecular levels**. Berlin: Springer Verlag, 1992. p. 70-84.

VILLANUEVA, G. B.; HERSKOVITS, T. T. Changes in the exposure of the tyrosyl and tryptophyl residues in trypsin due to diisopropylphosphoryl and benzamidine inhibition. **Biochemistry**, Washington, v. 10, n. 24, p. 4589-4594, nov. 1971.

WANG, A.; BOLEN, D. W. A naturally occurring protective system in urea rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. **Biochemistry**, Washington, v. 36, n. 30, p. 9101-9108, jul. 1997.

YANCEY, P. H.; SOMERO, G. N. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. **Biochemical Journal**, Portland, v. 183, n. 2, p. 317-323, nov. 1979.

YANCEY, P. H.; CLARK, M.E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, Washington, v. 217, n. 4566, p. 1214-1222, sep. 1982.

YANCEY, P. H.; BURG, M. B. Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 258, n. 1, p. R198-R204, jan. 1990.