

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

JORGE LUIZ REIS DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DA MOLÉCULA DE ATP E SEUS DERIVADOS
EM MEIO AQUOSO

São José dos Campos, SP.

2009

Jorge Luiz Reis de Oliveira

**“CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DA MOLÉCULA DE ATP E SEUS DERIVADOS
EM MEIO AQUOSO”**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Amadei Nicolau

São José dos Campos, SP

2009

O47c

Oliveira, Jorge Luiz Reis de
Caracterização óptica da molécula de ATP e seus derivados em meio aquoso./Jorge Luiz Reis de Oliveira.

Orientadores: Profs. Dr. Renata Amadei Nicolau; São José dos Campos, 2009.

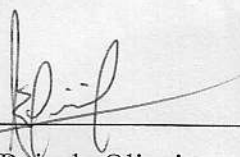
1 disco laser: color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

1. Trifosfato de Adenosina 2. Espectroscopia de fluorescência
3. Lasers I. Nicolau, Renata Amadei Orient. II. Título

CDU:576

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.



Jorge Luis Reis de Oliveira

São José dos Campos, de 2009.

JORGE LUIZ REIS DE OLIVEIRA

“CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DA MOLÉCULA DE ATP E SEUS DERIVADOS EM MEIO AQUOSO”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Profª Dra. **KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES** (UNIVAP) 

Profª. Dra. **RENATA AMADEI NICOLAU** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **NILTON SYOGO ARAKAWA** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **SÉRGIO HENRIQUE BEZERRA DE SOUSA LEAL** (UFPI) 

Profª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 07 de abril de 2009.

DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho primeiramente a minha família. Minha mãe Yeda, meu pai Luiz que fizeram e ainda fazem de tudo para que eu obtenha sucesso, e meus três irmãos, André Luiz, João Luiz e Pedro Luiz, que em todos os momentos, longe ou perto, de alguma maneira me ajudaram e sempre me apoiaram para que eu pudesse cumprir esta etapa.

A minha namorada Bianca, pessoa que apareceu em minha vida com uma alegria imensa e me deu ainda mais vontade de vencer com todo o seu amor.

Também dedico a minha orientadora, que desde os primeiros anos de faculdade me leva por um caminho no qual ela mesma já passou e que me orgulho muito em seguir seus passos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Prof. Dra Josepa Rigau, que foi reponsável pela minha ida a Holanda que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Daniel Sonnewend, meu amigo, que sempre fez de tudo para me ajudar mesmo de longe.

Ao Amigo e orientador Michal Heger, que foi a minha família na Holanda e sem sua ajuda, nada disso teria acontecido.

Ao ACAS GROUP, grupo de química da faculdade Vrije Universiteit, que me ensinou e me ajudou muito nos laboratórios.

Ao Prof. Dr. Martin Van Gemert por possibilitar a realização deste trabalho na Universidade de Amsterdam.

Agradeço à CAPES/PROSUP pela bolsa de estudos.

E a Sara Oliveira pelas pacientes aulas de Química.

A todas essas pessoas, o meu agradecimento ainda é pouco para expressar o quanto foram importantes nesta etapa da minha vida. OBRIGADO !

“O único Lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”.
(Albert Einstein)

“CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DA MOLÉCULA DE ATP E SEUS DERIVADOS EM MEIO AQUOSO”

RESUMO

Os organismos vivos necessitam de aporte contínuo de energia livre para que possam desenvolver determinadas funções. A energia livre utilizada nesses processos é originada no meio celular, mantendo o organismo em um estado de equilíbrio. Essa forma mais acessível de energia livre é denominada adenosina trifosfato (ATP). O papel central da ATP é a disponibilidade de energia na maioria dos processos celulares energético-dependentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da radiação eletromagnética (200-800 nm) sobre a molécula de ATP e seus derivados (ADP, AMP, Adenosina e Adenina), isoladamente e em conjunto, com variações de pH e densidade do meio, através de análise espectral (fluorometria e fotometria). Através da caracterização espectroscópica (200-800 nm) da molécula de ATP e seus derivados em meio aquoso pode-se concluir que o pico de absorção máxima da molécula de ATP e derivados ocorre em 260 nm, sugerindo que o grupamento da molécula responsável pela absorção da radiação é a adenina (presente em todos os compostos). Com a excitação em 260 nm, ocorre alta incidência de fluorescência na molécula de ATP quando comparado a seus derivados. Esta fluorescência acentuada do ATP sobre os derivados se dá devido à influência da cadeia de fosfatos e sua interação com a adenina. Também, foi possível verificar que existe uma forte influência do pH e da densidade do meio sobre as reações da molécula na fotometria e fluorometria, não tendo sido observado em estudos prévios.

Palavras-chave: Adenosina trifosfato, Espectroscopia de fluorescência, Laser.

OPTIC CHARACTERIZATION OF THE ATP MOLECULE AND ITS DERIVATIVES IN AQUEOUS MEDIUM

ABSTRACT

Alive organisms need continuous free energy input in order to develop their functions. The free energy used in those processes is generated in cellular environment, maintaining the organism in an equilibrium state. The most accessible form of free energy is named Adenosine triphosphate (ATP). The central role of the ATP is to provide energy in most cellular functions which are energy dependants. The aim of this study was to evaluate the laser influence on ATP and derivatives (ADP, AMP, Adenosine, Adenine), under pH variations and medium density. These analyses were obtained trough fluorescence and absorption spectroscopy. We could verify after these experiments that the absorption peak of ATP and derivatives occurs mainly at 260 nm. We could conclude that the part of the ATP molecule responsible for the light absorption is the Adenine (present in ATP and all other derivatives). We could also see that with excitation at 260 nm, ATP is fluorescent and present higher signal intensity, when compared with the other compounds. With these results, we were able to see an influence of the phosphate bond in the adenine. In addition, we could see that the pH and the medium density can influence its fluorescence reactions.

Keywords: Adenosine Triphosphate (ATP), fluorescence spectroscopy, laser

Lista de figuras e tabelas

Figura 1	Estrutura química da molécula de ATP (AMAT et al; 2006)	14
Figura 2	Variação da intensidade máxima de fluorescência do ATP obtido com soluções em concentração entre 0 μ M e 500 μ M	24
Figura 3	Variação da intensidade máxima de fluorescência do ATP obtido com soluções em concentração entre 0 e 50 μ M, demonstrando linearidade dos dados nestas concentrações	24
Figura 4	Espectro de absorção do ATP e seus derivados em pH padrão na concentração de 50 μ M	25
Figura 5	Espectro de absorção do ATP (50 μ M) e derivados (50 μ M) com pH ajustado. Pico de absorção a 260 nm. Linha de Base = Água MiliQ. A) ATP, B) ADP, C) AMP, D) Adenosina, E) Adenina	26
Figura 6	Espectro de fluorescência do ATP	27
Figura 7	Dados normalizados demonstrando a diferença entre os picos de absorção e de fluorescência do ATP.	28
Figura 8	de fluorescência do ATP (388 nm) obtido em diferentes pH	29
Figura 9	Diferença de intensidade de fluorescência do ATP em pH 3 no seu pico máximo, com a adição de NaCl a 1%, 5% e 15% da solução	30
Figura 10	A. Conformação padrão. B. Provável modificação na conformação da molécula de ATP com influência da luz. C. Provável impossibilidade de modificação conformacional devido à presença de NaCl	31
Figura 11	Gráfico normalizado para comparação entre o espectro de absorção e excitação do ATP e derivados. A) ATP, B) ADP, C) AMP, D) Adenosina, E) Adenina.	32
Tabela 1	Diferentes experimentos vs concentração de ATP e derivados utilizados	20

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2	Revisão de Literatura	13
2.1	ATP	13
2.1.1	ATP como fonte de energia	13
2.1.2	Síntese de ATP	13
2.2	Laser e ATP	15
3	Objetivos	18
4	Material e Métodos	19
4.1	Soluções	19
4.2	Espectrofotometria	20
4.2.1	Espectrofotometria com pH padrão	20
4.2.2	Espectrofotometria com oscilação de pH	20
4.3	Espectrofluorometria	21
4.3.1	Espectrofluorometria com pH padrão	21
4.3.2	Espectrofluorometria com oscilação de pH	21
4.3.3	Espectrofluorometria com oscilação de pH e presença de NaCl	22
4.4	Espectroscopia de excitação	22
5	Resultados e discussão	23
5.1	Espectrofotometria com pH padrão	25
5.2	Espectrofotometria com oscilação de pH	26
5.3	Espectrofluorometria com pH padrão	27
5.4	Espectrofluorometria com oscilação de pH	28
5.5	Espectrofluorometria de fluorescência com ajuste de pH e adição de NaCl	29
5.6	Espectroscopia de excitação	31
6	Conclusões	34
	Referências	35
	Anexo A – Certificação experimental	38

1 Introdução

Os organismos vivos necessitam de aporte contínuo de energia livre para que possam desenvolver determinadas funções. Dentre as principais funções celulares destacam como funções vitais: a performance mecânica durante a contração muscular e outros movimentos celulares, o transporte ativo de íons e moléculas, e a síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de um precursor. No corpo humano cada célula obtém energia através da oxidação e redução de nutrientes provenientes da dieta. A energia livre utilizada nesses processos é originada no meio celular, mantendo o organismo em um estado de equilíbrio (LEHNINGER, 2002). Essa forma mais acessível de energia livre é denominada adenosina trifosfato (ATP). O papel central da ATP é promover a disponibilidade de energia na maioria dos processos celulares energético-dependentes (KALCKAR, 1991). O ATP presente no citoplasma é sintetizado na mitocôndria através do processo de fosforilação oxidativa, que envolve uma série de reações redox na membrana interna da organela (FRIEDRICH; BOTTCHEER, 2004)

Segundo autores, a radiação eletromagnética na região visível e infravermelho próximo podem modificar a síntese (KASSAK et al., 2005) ou disponibilidade (KARU et al., 1996) da ATP. Este aumento de energia livre pode ser positivo principalmente em processo de modulação da resposta celular, como por exemplo, gradiente iônico transmembrana (KARU et al., 1999).

Na busca por novas opções terapêuticas o laser de baixa potência (TLBP) tem demonstrado grande eficácia no tratamento de alguns processos destacando-se: aceleração da reparação tecidual (REDDY et al., 2001), tratamento da dor e regeneração de tecidos nervosos (BYRNES et al., 2005), aumento da síntese de colágeno (RIGAU et al., 1996), melhor síntese de DNA e RNA no núcleo (KARU et al., 1998). Muitos autores atribuem estes efeitos da terapia ao aumento da concentração de ATP, contribuindo em diversas atividades metabólicas. Este aumento de ATP tem sido atribuído à interação da radiação eletromagnética, com citocromos celulares. Contudo, até o momento poucos estudos foram realizados visando observar a interação entre a molécula de ATP e diferentes comprimentos de onda.

2 Revisão de Literatura

Visando um melhor entendimento da molécula de ATP foi realizada esta revisão de literatura onde também verificamos os estudos realizados até hoje sobre a interação entre a molécula de ATP e o laser de baixa potência.

2.1 ATP

As células utilizam uma forma de energia livre chamada de adenosina trifosfato (ATP). Esta molécula é sintetizada em nível mitocondrial para realização de inúmeras atividades celulares.

2.1.1 ATP como fonte de energia

Para o funcionamento do corpo humano é necessário que cada célula obtenha uma energia mínima para exercer suas funções básicas. Esta energia é obtida através da oxidação de nutrientes provenientes da dieta. Parte dessa energia é transformada em uma forma altamente acessível, antes de ser utilizada na movimentação celular, transporte ativo de moléculas e biossíntese. Essa forma de energia livre da qual as células utilizam é denominada adenosina trifosfato (ATP), que tem como função principal, a doação de energia para as células executarem suas funções dependentes de energia (BERG et al., 2002).

2.1.2 Síntese de ATP

O ATP é sintetizado na mitocôndria presente no citoplasma através do processo de fosforilação oxidativa, que é uma via metabólica que utiliza energia liberada pela oxidação de nutrientes de forma a produzir a Adenosina Trifosfato (ATP). O processo refere-se à fosforilação do ADP em ATP, utilizando para isso a energia liberada nas reações de oxidação-redução na cadeia metabólica. Este processo ocorre na membrana interna da organela (REES; HOWAR, 1999). Em condições aeróbicas, são sintetizadas 36-38 moléculas de ATP a partir de uma molécula de glicose enquanto que em condições anaeróbicas, onde o nível de oxigênio é insuficiente para o metabolismo e

síntese de ATP através da respiração celular, a molécula de glicose é totalmente oxidada no citoplasma para que se obtenham duas moléculas de ATP e um Piruvato no processo denominado glicólise (SCHILLING et al., 2000).

O ATP é um nucleotídeo constituído por uma adenina ligada a uma ribose, formando a adenosina, que por sua vez é ligada a uma cadeia de fosfatos que por sua quantidade determina sua função biológica (Figura 1).

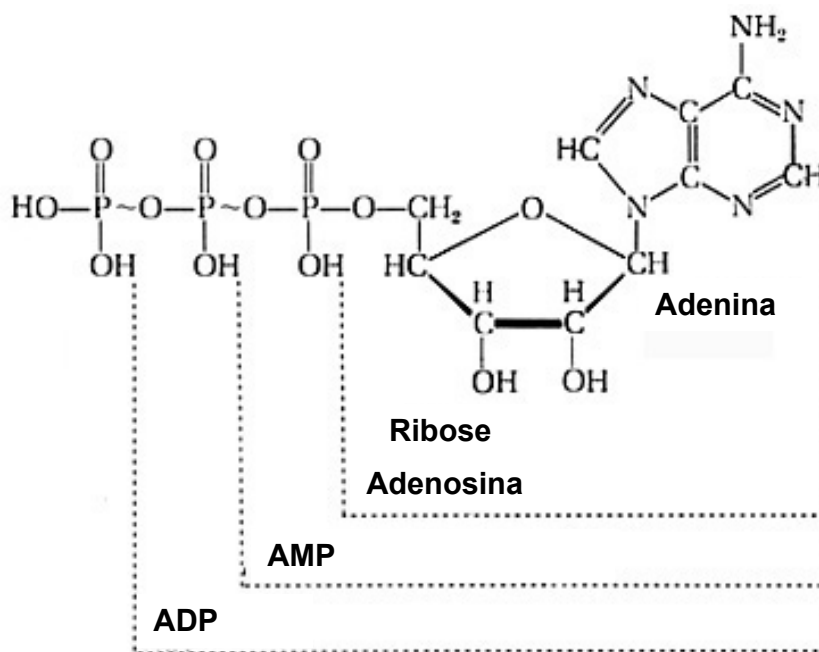


Figura 1. Estrutura química da molécula de ATP (AMAT, 2006).

Para compreender o papel do ATP como um carreador de energia deve-se levar em consideração sua cadeia trifosfato, que faz do ATP uma molécula rica em energia devido à presença de duas ligações fosfato-oxigênio (o fosfato ligado à adenosina formando a AMP possui diferentes características, pois está ligada a um grupo CH_2O e não a outro grupo fosfato). Uma grande quantidade de energia (30,5 KJ/mol) é liberada quando a molécula de ATP é quebrada, liberando um fosfato ou dois, formado ADP ou AMP respectivamente. Por esta razão a ATP é considerada a molécula “chave” para todas as reações metabólicas celulares entre outros processos (POUCHERT, 1981).

A molécula de ATP apresenta uma forte absorção na região do UV, com dois importantes picos em 210 nm e 260 nm, sendo considerada uma molécula “transparente” para outros comprimentos de onda como a região do visível e do infravermelho próximo (KARU et al., 2004).

2.2 Laser e ATP

Karu et al. (1995), iniciaram os estudos da influência da TLBP sobre a produção de ATP para tentar buscar uma teoria que explicasse os efeitos que vinham sendo obtidos com esta terapia. Neste estudo os autores utilizaram cultura de células do tipo HeLa que foi submetida à irradiação com laser de He-Ne (632,8 nm, 100 J/cm², 10s) e a quantidade de ATP foi medida através da utilização da técnica de bioluminescência luciferina-luciferase (5-45 min) após irradiação. A quantidade de moléculas de ATP na fase controle das células em cultura manteve-se em $(0,79 \pm 0,09 \times 10^{-15}/\text{célula})$. Quinze minutos após a irradiação, este nível de ATP aumentou 170%, atingindo seu pico máximo. Após 20 minutos da irradiação o nível de ATP se encontrava igual ao controle. Com este estudo os autores concluíram que o nível de ATP celular depende da fase de desenvolvimento que a célula se encontra e que o laser promove a redução de ATP quando a célula encontra-se na fase Log de desenvolvimento.

Karu et al. (2004) verificaram que o número de células ligadas ao substrato de vidro aumenta quando a cultura de células HeLa é irradiada com laser no infravermelho próximo antes do plaqueamento. Essa maior adesão pode ter ocorrido mediante sinalização induzida por luz, para o centro catalítico do citocromo-c-oxidase. Análises comparativas, realizadas neste estudo, permitiram concluir que os cromóforos CuA e CuB do citocromo-c-oxidase podem estar envolvidos como fotorreceptor para a mitocôndria.

Manteifel e Karu (2005) realizaram estudos empregando laser de He-Ne (632,8 nm) em leveduras na fase Log de desenvolvimento, realizando a análise da estrutura da mitocôndria após irradiação. Após exposição a uma dose de 46 J/cm², além de verificar um aumento na proliferação celular e ativação da cadeia respiratória e enzimática, observaram uma alteração estrutural mitocondrial um aumento no tamanho da superfície das cristas da membrana interna da mitocôndria. Como a síntese do ATP se dá nessas cristas, os resultados levaram a concluir que este aumento da área de superfície é responsável pelo aumento da síntese de ATP pela mitocôndria após irradiação com laser na região do vermelho.

Oron et al. (2007) verificaram o efeito da irradiação com laser GaAs (808 nm) na região do infravermelho próximo sobre a produção de ATP em células tronco neurais humanas em cultura com dose de 0,05 J/cm² e potência de 50 mW, com determinação

do ATP 10 minutos após irradiação. A quantidade de ATP após irradiação nas células tratadas foi de 7513 ± 970 unidades de ATP, o que foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que as células não tratadas que foi de 3808 ± 539 unidades de ATP, concluindo que a aplicação do laser na região do infravermelho aumenta significativamente a produção de ATP nesse sítio de célula. Este fato explica em parte efeitos clínicos comumente encontrados quando esta terapia é empregada em processo de reparação tecidual.

Hu et al. (2007), baseado nos trabalhos que demonstram que a luz visível (400-700 nm) influencia positivamente as funções celulares e que o fotorreceptor citocromo-c-oxidase encontrado na parede da mitocôndria está relacionado com este efeito, realizou um estudo com objetivo de investigar os possíveis mecanismos que fazem com que o laser de He-Ne promova este efeito de biomodulação nos tecidos. Usando como modelo para proliferação células do tipo A2058 após a irradiação foi verificado aumento no potencial de membrana da mitocôndria, ATP e AMP através do aumento da atividade do citocromo-c-oxidase dentro da cadeia da fosforilação oxidativa e da enzima *Jun N-terminal kinase* (JNK). Estes efeitos promoveram um aumento significativo na proliferação celular, que foi inibido quando os autores adicionaram à cultura um inibidor da enzima JNK. Estes resultados sugerem que a irradiação da cultura com laser He-Ne promoveu efeitos positivos quanto à estimulação celular e que envolve também a ativação da enzima JNK presente no final da cadeia de fosforilação oxidativa responsável pela síntese do ATP.

Quando as células são irradiadas com comprimentos de onda na região do visível e infravermelho, uma variedade de efeitos estimulatórios é observada em seu metabolismo. Para explicar os efeitos das radiações eletromagnéticas, pesquisadores tentam identificar os grupamentos cromóforos que estão envolvidos nas moléculas e seus processos. Entretanto, o mecanismo de absorção da luz por um grupamento cromóforo não explica muitas das observações experimentais e, portanto o mecanismo primário para as respostas celulares a luz ainda é obscuro. Além da habilidade dos fótons de produzir excitação eletrônica nos cromóforos, geram a formação de campos eletromagnéticos no meio, os quais podem interagir com estruturas polares e produzir transições dipolares em diferentes níveis bioquímicos e celulares (AMAT et al., 2006).

Em 2004, Amat et al. realizaram um estudo básico sobre o comportamento bioquímico do ATP após a irradiação com lasers de diodo com 635 e 830 nm, em diferentes doses. Os autores verificaram o pico de luminescência, a velocidade de

reação e a área sob a curva de luminescência em 2×10^{-9} mol/L de ATP na reação de luminescência luciferina-luciferase antes e depois da irradiação das moléculas. O espectro de absorção do ATP em concentração de 3×10^{-3} mol/L foi medido entre 650 e 900 nm após a irradiação com laser 635 e 830 nm. Neste estudo eles obtiveram como resultado diferenças significativas nos parâmetros medidos quando o ATP foi irradiado com ambos os comprimentos de onda. O espectro de absorção do ATP irradiado e não irradiado mostraram diferença físico-química (luminescência, espectro de absorção) significativa na molécula após irradiação com ambos os lasers. Os autores concluíram que a luz visível e infravermelha, com os parâmetros utilizados, alteram o comportamento bioquímico das moléculas de ATP.

Em estudo posterior, Amat et al. (2005) verificaram os efeitos da luz no espectro visível (655 nm) e do infravermelho próximo (830 nm) na solução de ATP, observando que a adição de ATP à reação de hexoquinase causou aumento significativo da taxa de reação quando avaliados os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten K_m e V_{max} . A clivagem do ATP irradiado pela hexoquinase ocorreu em menor tempo. Estas alterações foram comprimento de onda e dose dependentes. A excitação do ATP com luz ultravioleta (260 nm) induziu a emissão de fluorescência que foi diminuída com a adição de Mg^{2+} devido à ligação iônica com os fosfatos, que são as estruturas que modificam a fluorescência produzida pelos dipolos de adenina. A irradiação desta solução de ATP e Mg^{2+} usando luz com 655 e 830 nm, aumentou a fluorescência, possivelmente devido à quebra da ligação do Mg^{2+} dos fosfatos. Com a análise destes resultados, concluíram que a luz visível e infravermelha modifica o comportamento químico do ATP na reação de hexoquinase e a intensidade de fluorescência da molécula, deste modo, alterando a ligação do Mg^{2+} aos átomos de oxigênio do grupo fosfato, que compõe a porção terminal da molécula de ATP.

Considerando o exposto, estudos que caracterizem a reatividade da molécula de ATP com diferentes comprimentos de onda, associados à diversas condições do meio se fazem necessários de forma a elucidar quais mecanismos básicos estão relacionados com a interação laser-tecido biológico.

3 Objetivos

Avaliar a influência da radiação eletromagnética sobre a molécula de ATP e seus derivados (ADP, AMP, Adenosina e Adenina), isoladamente e em conjunto, com variações de pH e densidade do meio, através de análises espectroscópicas (fluorometria e fotometria).

4 Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido no Centro de Laser da *Vrije Universiteit* (Universidade Livre) em Amsterdã, no Centro de Laser do Centro Médico Acadêmico da *Universiteit van Amsterdam* (Anexo A – Certificação experimental) e Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (Univap).

Este estudo foi dividido em 4 etapas:

- I) Avaliação por espectrofotometria picos de absorção da molécula de ATP e derivados (ADP, AMP, adenosina e adenina).
- II) Avaliação por espectrofluorometria picos de fluorescência da molécula de ATP e derivados (ADP, AMP, adenosina e adenina).
- III) Confirmação dos dados de espectrofluorometria a partir de espectroscopia de excitação.
- IV) Avaliação da influência do grupo terminal da molécula de ATP sobre os picos de absorção e fluorescência.

4.1 Soluções

Os compostos padrões utilizados para todos os experimentos foram: ATP 99% (Acros[®]); AMP 99% (Fluka[®]); Adenina 99% (Sigma[®]) e Adenosina 99% (Sigma[®]). Os compostos foram preparados a uma concentração de 5 mM usando água ultrapura (MilliQ[®], Millipore Corporate, Billerica, MA) (pH padrão *in vitro* – 5,5). A partir da solução a 5 mM, sucessivas diluições foram realizadas para a obtenção de diferentes concentrações conforme Tabela 1. Estas diluições foram realizadas, visando otimizar as concentrações das soluções para o estudo dos picos de fluorescência da molécula investigada (ATP). Este estudo foi realizado considerando as concentrações previamente estabelecidas por AMAT et al. (2005). Em todos os experimentos as soluções foram analisadas em cubetas de quartzo de 1x1 cm.

Tabela 1. Diferentes experimentos vs concentração de ATP e derivados utilizados.

Tipo de Experimento	Concentrações utilizadas (μM)
Espectrofotometria com pH padrão	50
Espectrofotometria com oscilação de pH	50
Espectrofluorometria com pH padrão	5,10,20,25,30,40,50
Espectrofluorometria com oscilação de pH	50
Espectrofluorometria com oscilação de pH e presença de NaCl	50
Espectroscopia de excitação	50

4.2 Espectrofotometria

A espectrofotometria é uma técnica onde é possível verificar a interação da radiação eletromagnética e a matéria, onde são comparadas as intensidades de um feixe de laser antes e depois da interação com a amostra (PERKIN ELMER, 2000).

Para realização dos experimentos foi utilizado o espectrofotômetro Varian Cary 50 BIO UV-VIS (Walnut Creek, Califórnia, USA) para a obtenção dos espectros de absorção do ATP e seus derivados.

4.2.1 Espectrofotometria com pH padrão

Os espectros de absorção de cada composto foram obtidos através do espectrofotômetro, com correção de linha de base e varredura entre 200-800 nm. Estes experimentos foram realizados com todos os compostos na concentração de 50 μM (tabela 1).

4.2.2 Espectrofotometria com oscilação de pH

O ATP e seus derivados foram diluídos em solução tampão de fosfato a 10 mM. Após o preparo das soluções estas foram submetidas à medida do espectro de absorção em diferentes condições de pH e em concentração de 50 μM .

4.3 Espectrofluorometria

A espectrofluorometria é uma técnica que permite detectar o nível de fluorescência através da comparação dos feixes de laser antes e depois da interação com uma molécula. Esta reação de fluorescência ocorre quando a molécula, após excitação pelo laser, passa do estado fundamental para um estado excitado, quando retorna ao estado fundamental, libera então a energia absorvida anteriormente, que é detectada pelo espectrofluorômetro (PERKIN ELMER, 2000).

Para a obtenção de espectros de fluorescência, foi utilizado um espectrofluorômetro LS50B (Pelkin Elmer Corporation, Shelton, Connecticut, USA). As concentrações utilizadas nesses experimentos foram: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 μM em pH padrão (Tabela 1).

4.3.1 Espectrofluorometria com pH padrão

Após as diluições, as cubetas com a amostra foram colocadas na câmara de amostras do aparelho LS50B e os parâmetros ajustados para: comprimento de onda de excitação em $259 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$, varredura entre 260 nm e 500 nm. Esse procedimento foi realizado em triplicata com cada composto em cada concentração para a obtenção de uma média.

4.3.2 Espectrofluorometria com oscilação de pH

As soluções foram preparadas usando ATP e seus derivados diluídos nas soluções tampão com pH 3, 7 e 11. Foram obtidas soluções tampão em concentrações de 10 mM, 50 mM e 100 mM. Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando novamente o aparelho LS50B (Pelkin Elmer Corporation, Shelton, Connecticut, USA) com os mesmos parâmetros utilizados anteriormente. A concentração das amostras de ATP e seus derivados diluídos na solução tampão foi de 50 μM e o pH foi ajustado de 2 até 11, com o uso de NaCl e HCl. Estes experimentos foram realizados em triplicata com três diferentes amostras de cada composto a fim de se obter uma média dos dados.

4.3.3 Espectrofluorometria com oscilação de pH e presença de NaCl

Com o objetivo de promover estabilidade iônica do meio, foram realizadas medidas de fluorescência dos compostos ATP e seus derivados com a adição de NaCl às soluções em concentrações de 1%, 5% e 15%, pH 3, 7 e 11 respectivamente. Após a adição do NaCl as soluções de 50 μ M de ATP e derivados foram submetidas ao aparelho LS50B para obtenção das medidas de fluorescência. Estes experimentos também foram realizados em triplicata para cada composto.

4.4 Espectroscopia de excitação

Como objetivo de obter os espectros de excitação das amostras, utilizou-se o mesmo equipamento empregado para obtenção de medidas de fluorescência, o LS50B (Pelkin Elmer Corporation, Shelton, Connecticut, USA). Os parâmetros para obtenção do espectro de excitação foram definidos a partir da obtenção do comprimento de onda de emissão, ou seja, intensidade máxima de fluorescência de cada composto. As medidas foram realizadas em triplicata.

5 Resultados e discussão

A fim de estabelecer a concentração ideal para os experimentos com ATP, foram realizados testes com diferentes concentrações entre 0 (somente água ultrapura) e 500 μM . O teste realizado consistiu na obtenção do espectro de fluorescência do ATP para que fosse possível identificar qual a concentração que possibilitava a melhor visualização do sinal de fluorescência. A partir destes experimentos foi verificado que a fluorescência do ATP é dependente da concentração. É possível visualizar nas Figuras 2 e 3, que a intensidade máxima de fluorescência aumenta gradativa e linearmente até a concentração de 50 μM , para depois atingir seu pico máximo em 150 μM .

A partir de 200 μM este sinal vai decaindo até chegar a níveis muito baixos em 500 μM . A princípio, segundo estudos prévios de Amat et al. (2005), estes testes deveriam ser realizados com concentração de 2 mM, contudo segundo teorias básicas de espectroscopia de fluorescência (WILLIAMS, 1980), em concentrações muito altas (como é o caso de 2 mM de ATP em água) ocorre o efeito do “filtro interno”. Neste fenômeno onde ocorre a reabsorção da luz emitida no interior da solução por moléculas (fluoróforos), que estão em grande número devido à alta concentração. Concentrações menores apresentaram crescente e linear intensidade máxima de fluorescência. Acima 50 μM a intensidade máxima de fluorescência não era linear e a partir de 150 μM havia decaimento da intensidade máxima de forma linear linearidade (Figura 2 e 3). Desta forma a concentração estipulada para o presente estudo foi de 50 μM .

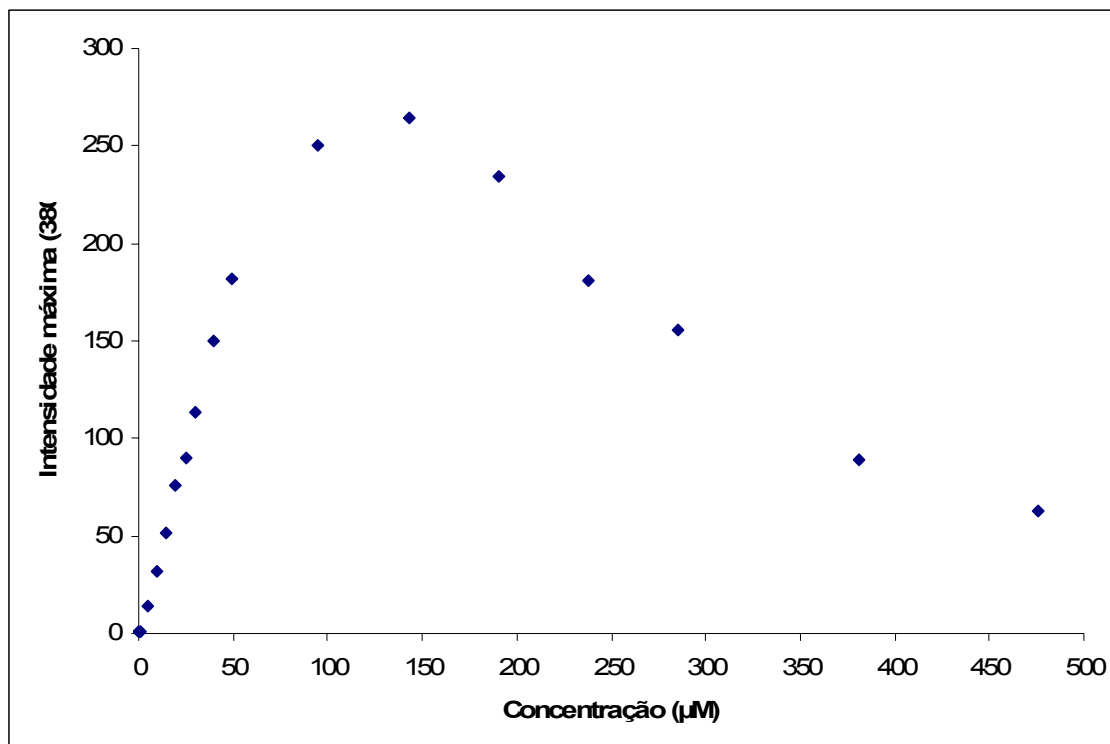


Figura 2: Variação da intensidade máxima de fluorescência do ATP obtido com soluções em concentração entre 0 μM e 500 μM .

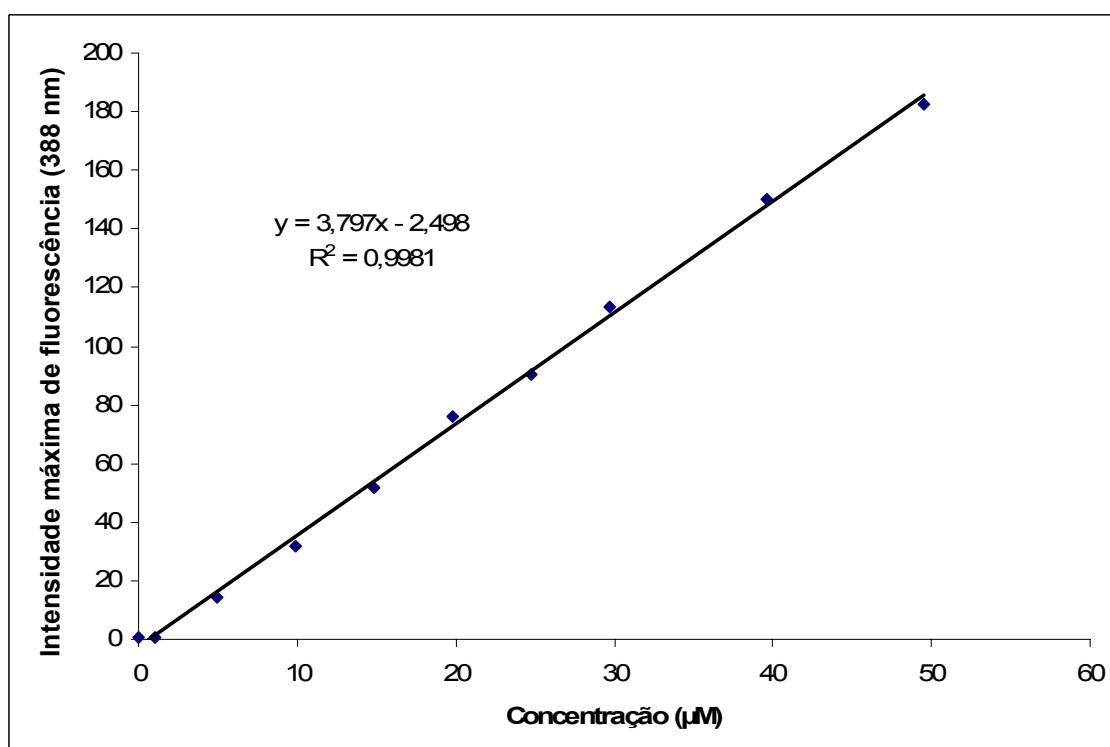


Figura 3: Variação da intensidade máxima de fluorescência do ATP obtido com soluções em concentração entre 0 e 50 μM , demonstrando linearidade dos dados nestas concentrações.

5.1 Espectrofotometria com pH padrão

Após as medidas realizadas anteriormente, foi possível obter os espectros de absorção do ATP e seus derivados, onde verificamos que todos os compostos apresentam o pico de absorção em $259 \pm 0,5$ nm, região do ultravioleta no espectro eletromagnético (Figura 4). Estes resultados sugerem que a parte da molécula responsável pela absorção de energia é a adenina, por ser a única estrutura comum a todos os compostos utilizados. Fato justificado pelo efeito de ressonância que ocorre pela polarização das ligações π (dupla ligação) presentes neste grupamento heterocíclico. Durante esse processo, ocorre a migração de elétrons entre os heteroátomos, logo, absorção e liberação de energia pela adenina (MORRISSON et al., 1992). O pico de absorção da adenina em 259 nm coincide com dados clássicos como os apresentados por Davis e Norris (1963). Estudos recentes também corroboram com os dados obtidos no presente estudo (SANTHOSH; MISHRA, 1992).

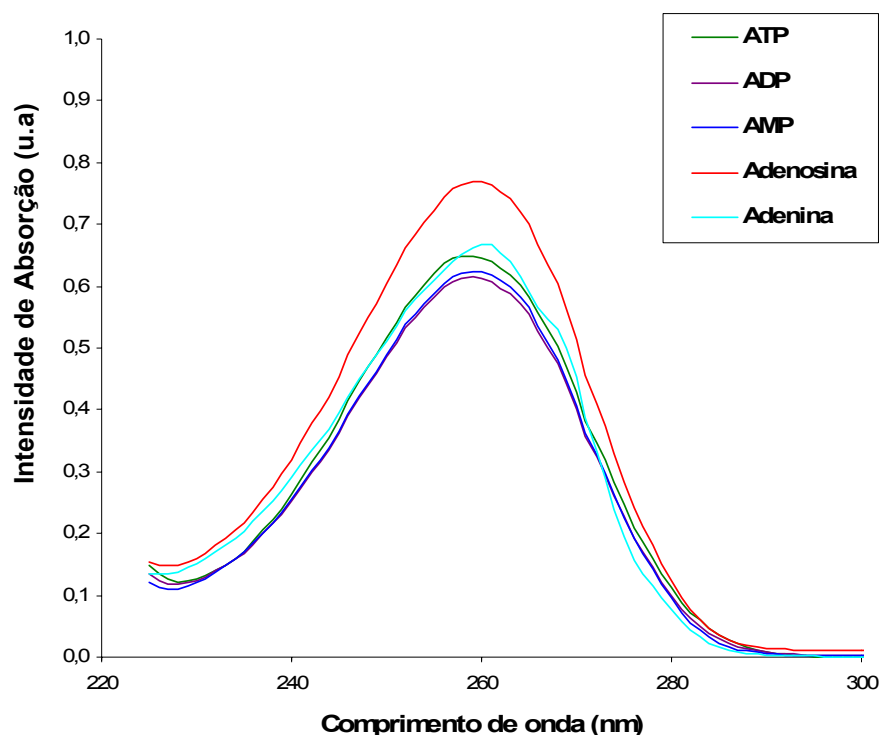


Figura 4: Espectro de absorção do ATP e seus derivados em pH padrão na concentração de 50 μ m.

5.2 Espectrofotometria com oscilação de pH

Realizando-se as medidas com em diferentes valores de pH para os diversos compostos observou-se que esse parâmetro não altera consideravelmente o espectro de absorção do ATP e seus derivados, conforme pode ser verificado na figura 5.

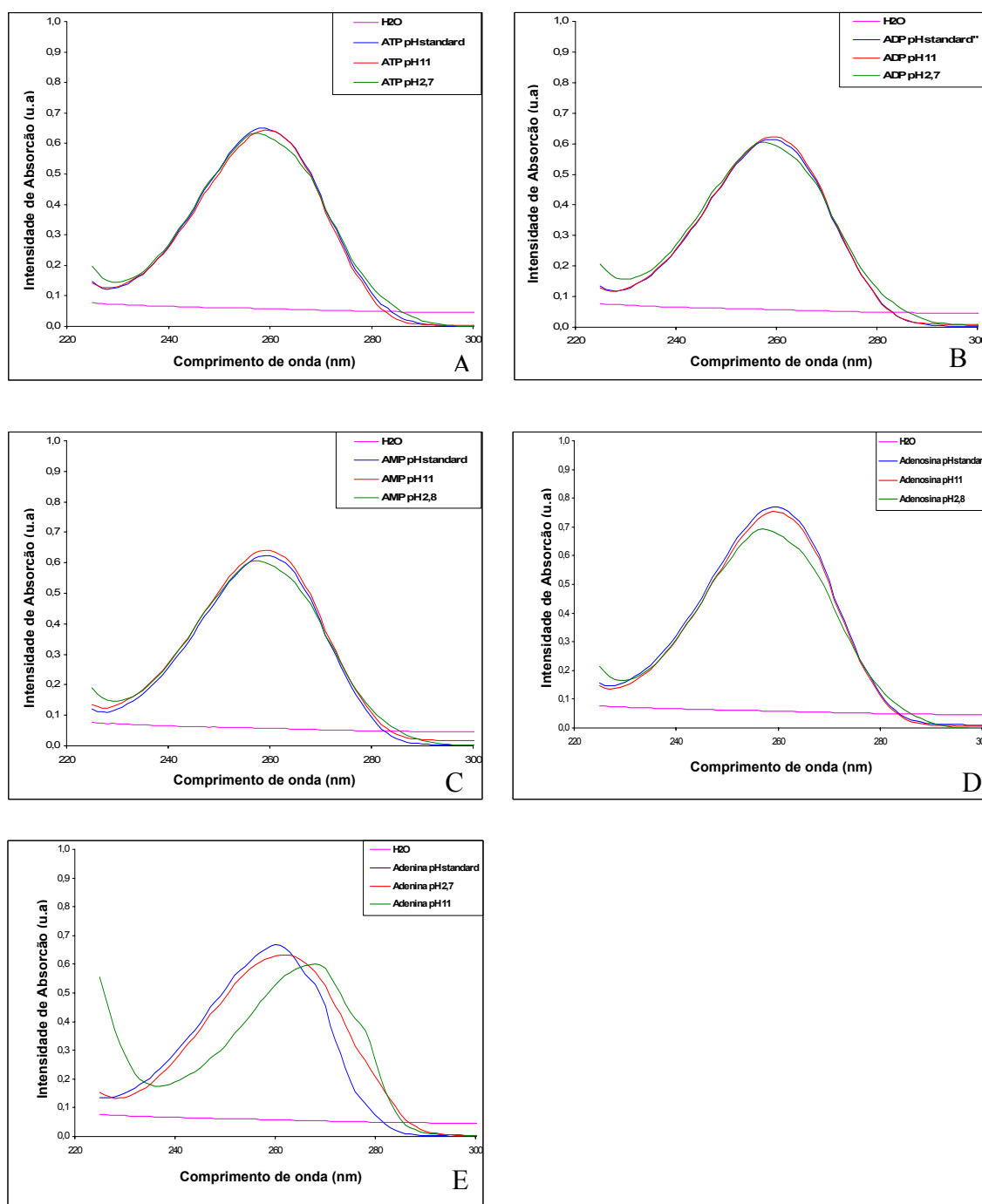


Figura 5: Espectro de absorção do ATP (50 μM) e derivados (50 μM) com variações de pH. Pico de absorção a 260 nm. Linha de Base = Água Ultrapura. A) ATP, b) ADP, C) AMP, D) Adenosina, E) Adenina.

5.3 Espectrofluorometria com pH padrão

Uma vez obtido o pico de máxima absorção dos compostos, foi possível obter o espectro de fluorescência da molécula de ATP e seus derivados. Com este experimento, verificou-se que o ATP possui alta intensidade de fluorescência na concentração testada (50 μM). Intensidades menores são observadas para os derivados da molécula de ATP (intensidade do ATP > ADP > Adenina > AMP > Adenosina) conforme pode ser verificado nas figuras 6 e 7.

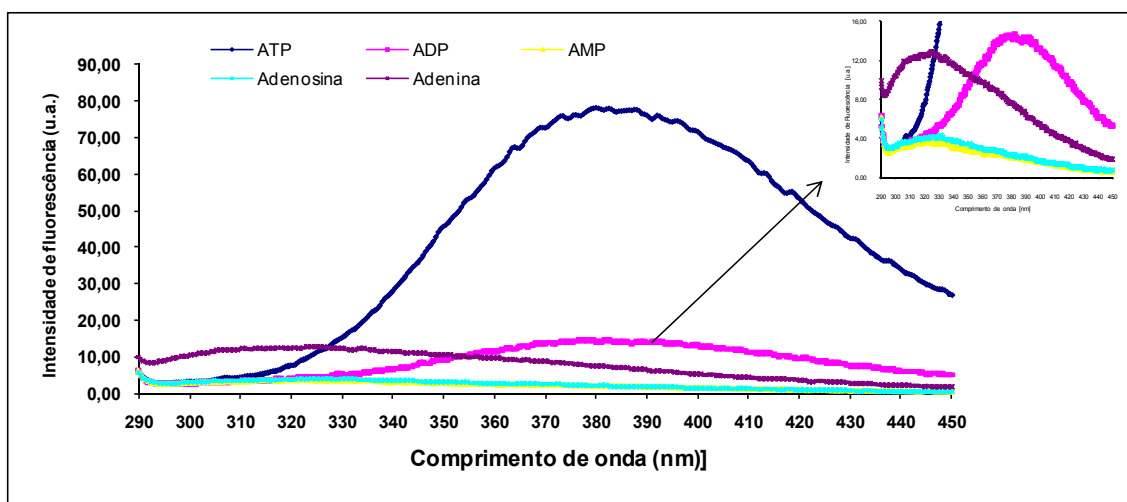


Figura 6: Espectro de fluorescência do ATP e seus derivados. Em evidência diferenças espectrais na fluorescência dos derivados de ATP.

Após a normalização e sobreposição dos gráficos, verificamos que quanto maior a presença de íons fosfato maior a intensidade de fluorescência do composto. Estes resultados sugerem que o grupamento da molécula de ATP, onde os fosfatos estão presentes, promove uma influência no sinal de fluorescência, principalmente quando há dois ou três fosfatos, ou seja, ADP e ATP respectivamente. Quando existe apenas um fosfato ligado à adenosina, a fluorescência diminui quando comparada a adenina. Este fenômeno pode ser observado pela mudança de conformação da molécula através do dobramento resultante da atração entre os elétrons livres de oxigênio da porção terminal (dois últimos fosfatos) e os nitrogênios livres da adenina, gerando uma maior força de campo elétrico e conseqüente maior energia, fazendo com que a ressonância na adenina seja mais intensa (BEYER et al., 1997).

Utilizando a espectroscopia de fluorescência foi possível analisar ainda, o comportamento da liberação de energia absorvida pelas moléculas. Todos os compostos apresentaram uma movimentação de Stoke maior que 8000 números de onda, o que sugere que a fluorescência não é a fonte primária de emissão da energia absorvida por estas moléculas (LAKOWICZ, 1983). A variação de Stokes está diretamente relacionada à definição de condição primária da fluorescência como fonte de emissão de energia. Variações acima de 8000 números de onda indicam que existe outra fonte primária de liberação de energia absorvida.

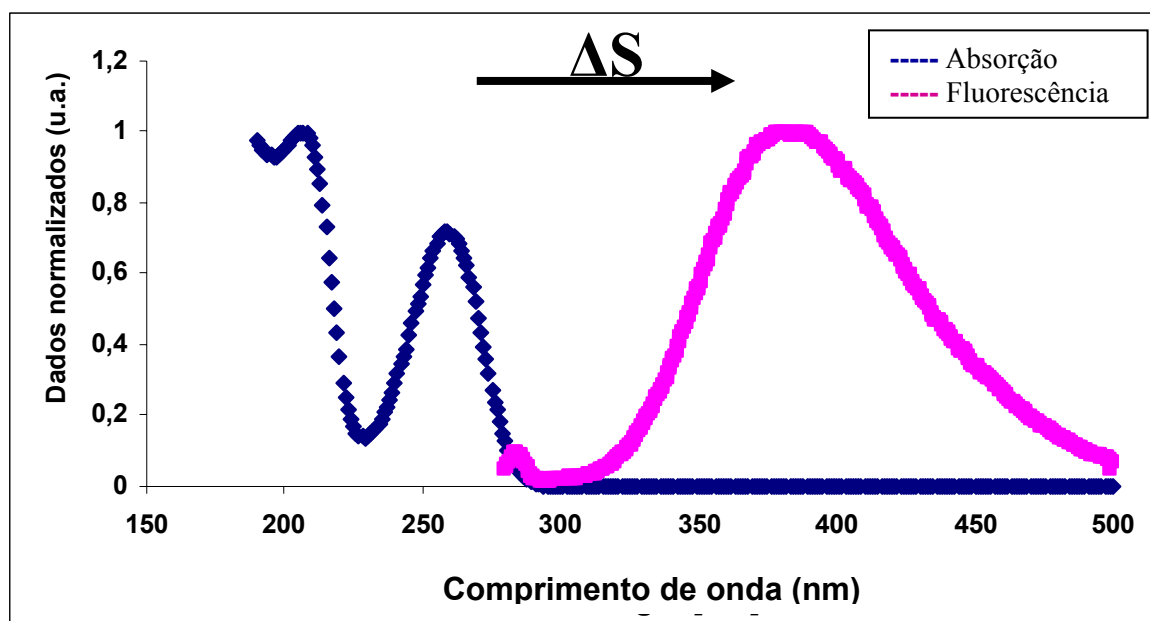


Figura 7: Dados normalizados demonstrando a diferença entre os picos de absorção e de fluorescência do ATP.

5.4 Espectrofluorometria com oscilação de pH

Com a variação do pH, e conseqüentemente da concentração hidrogeniônica no meio, foram obtidos resultados indicativos de maior fluorescência em soluções ácidas (Figura 8).

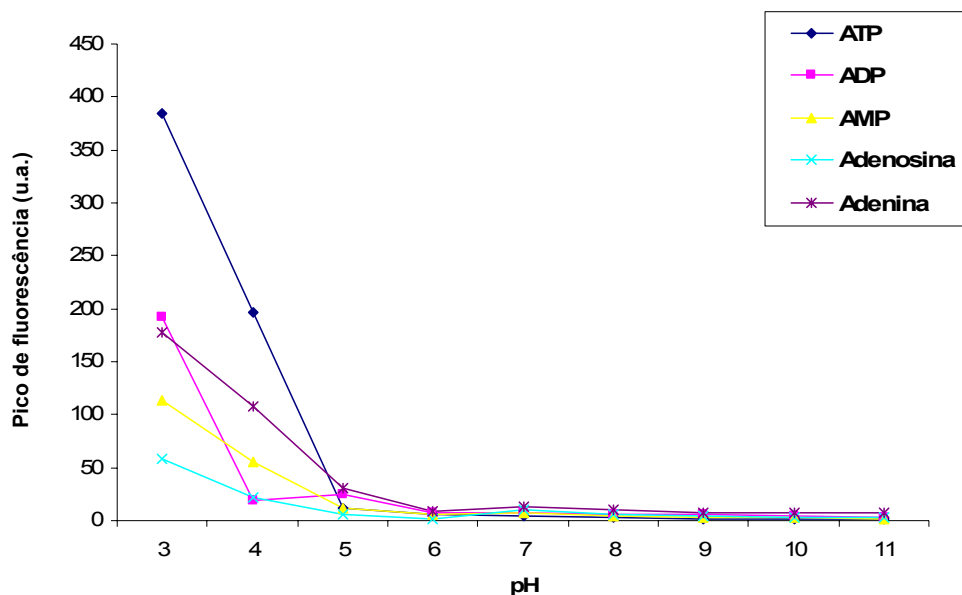


Figura 8: Picos de fluorescência do ATP (388 nm) obtido em diferentes pH.

Quando os compostos foram solubilizados em soluções com baixo pH, a intensidade de fluorescência foi aumentada quando comparada aos experimentos anteriores em $\text{pH}=7$, mostrando que o meio ácido é preponderante para a emissão fluorescente por esses compostos. Quando solubilizados a soluções com um alto pH, o sinal de fluorescência é reduzido a quase zero. Estes resultados sugerem que a intensidade da fluorescência dos compostos depende da concentração hidrogeniônica do meio, inferindo que a fluorescência é influenciada pela transferência protônica que pode ocorrer na Adenina em todos os derivados do ATP. Esta influência pode se dar na molécula através da afinidade entre os átomos de hidrogênio livres, e a molécula, principalmente na adenina, aumentando a força do campo elétrico, fazendo com que a reação de troca de energia com a luz seja mais intensa, conseqüentemente observando maior intensidade do sinal (BEYER et al., 1997).

5.5 Espectrofluorometria de fluorescência com ajuste de pH e adição de NaCl

Os resultados permitiram inferir que a porção terminal da molécula de ATP, ou seja, último grupamento fosfato tem influência sobre a fluorescência. Esta influência promove modificações na estrutura molecular quando irradiada, alterando a intensidade emitida pela adenina (Figura 9), que é a parte da molécula que absorve e libera a energia

fornecida pela luz nos diferentes comprimentos de onda empregados. Quanto maior a concentração de NaCl e em baixo pH (pH 3) maior a estabilidade da molécula de ATP, reduzindo a possibilidade de modificação conformacional e interferência sobre a adenina (ODIJK, 1994).

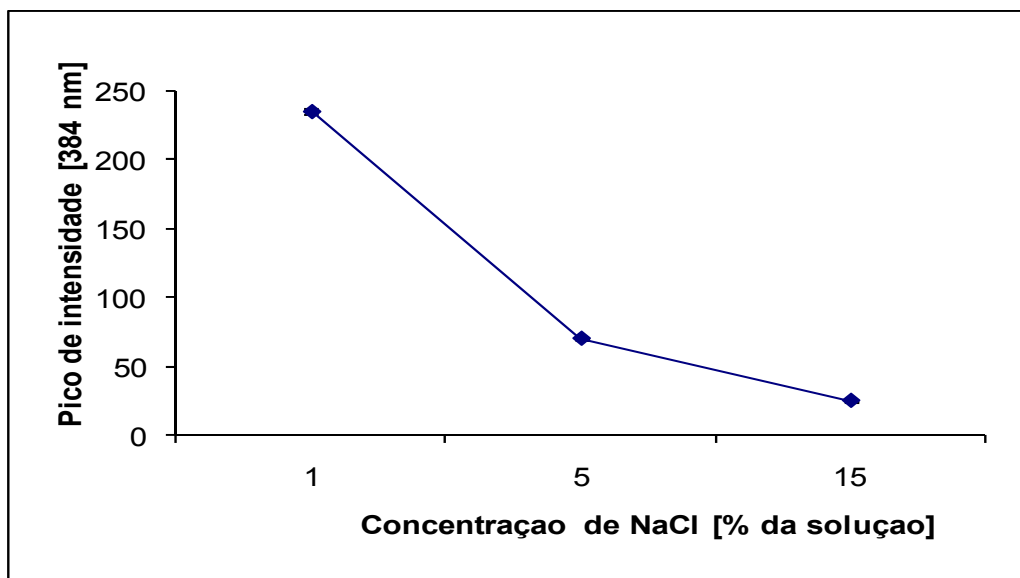


Figura 9: Diferença de intensidade de fluorescência do ATP em pH 3 no seu pico máximo, com a adição de NaCl a 1%, 5% e 15% da solução.

Estes experimentos possibilitaram verificar a estabilidade do meio a partir da adição de moléculas de NaCl à solução, não permitindo que a porção terminal do ATP formasse outra conformação que pudesse exercer alguma influência sobre a adenina. Esta estabilidade se dá, pois o NaCl é um sal, ou seja, uma estrutura mais densa, que não tem afinidade com a molécula de ATP como o hidrogênio tem, atuando na solução como uma barreira ao dobramento da molécula, que é a hipótese que verificamos para a influência da porção terminal de fosfatos. (BEYER et al., 1997) (Figura 10).

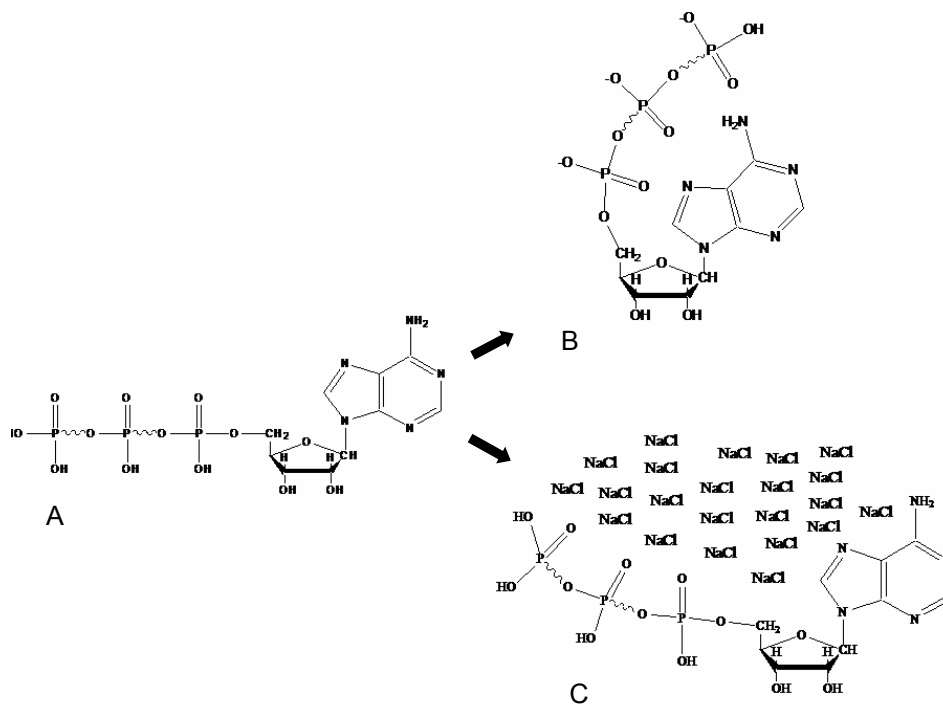


Figura 10: A. Conformação padrão. B. Provável modificação na conformação da molécula de ATP com influência da luz. C. Provável impossibilidade de modificação conformacional devido à presença de NaCl.

5.6 Espectroscopia de excitação

O espectro de excitação do ATP e seus derivados foram obtidos para todos os compostos utilizados anteriormente.

Utilizando o comprimento de onda referente ao pico de fluorescência, foi obtido o espectro de excitação do ATP e derivados, conforme pode ser verificado na Figura 11. Para o ATP e ADP os parâmetros foram os seguintes: pico de emissão: 280 ± 5 nm, varredura: 200-360 nm. Para AMP, Adenosina e Adenina os parâmetros foram: pico de emissão: 254 ± 5 nm, banda de varredura: 200-300 nm.

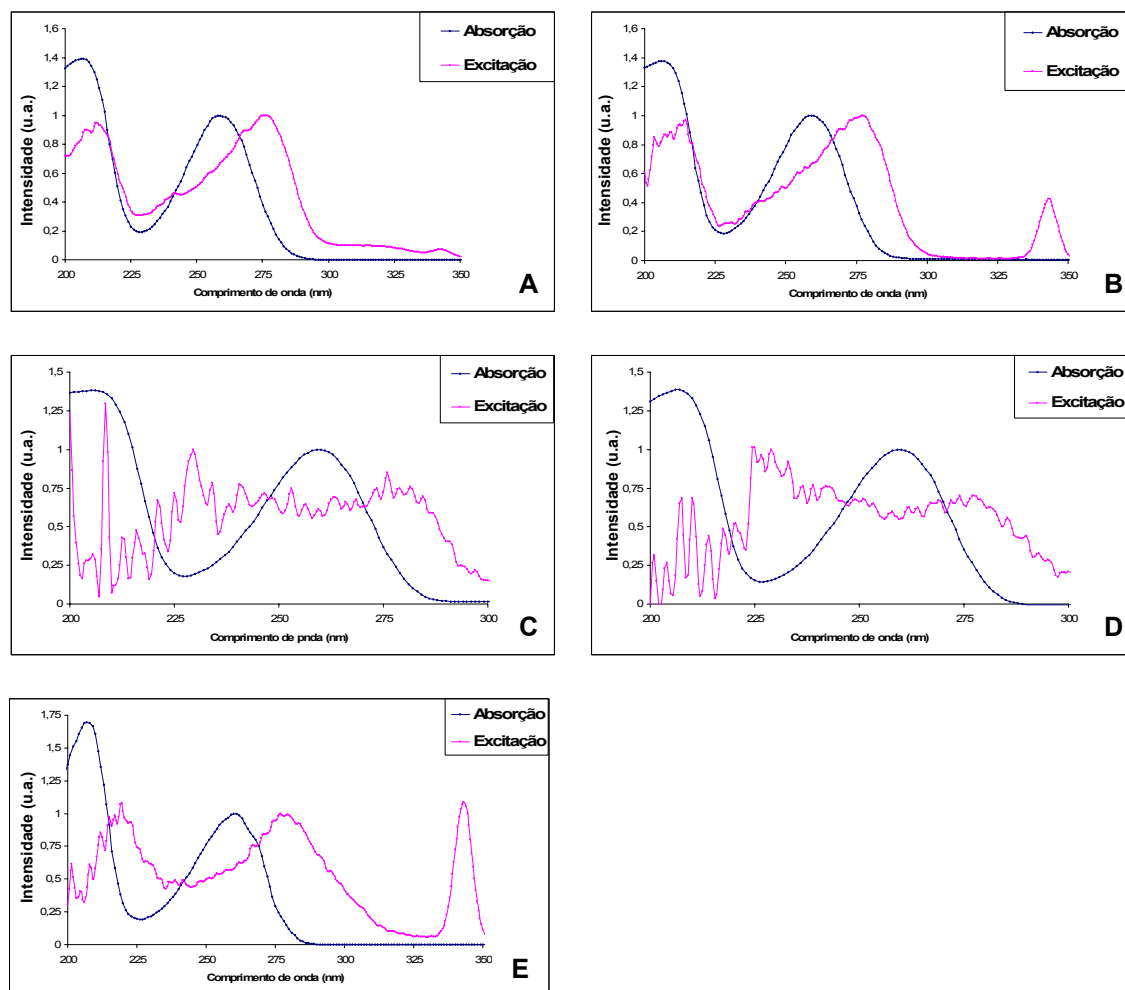


Figura 11: Gráfico comparativo entre o espectro de absorção e excitação do ATP e derivados. A) ATP, B) ADP, C) AMP, D) Adenosina, E) Adenina.

O pico de excitação deve ser o mais próximo possível do espectro de absorção, uma vez que essa é uma técnica utilizada para confirmar se realmente são as moléculas dos compostos e não impurezas que estão absorvendo a energia entregue durante a irradiação das amostras. Os dados normalizados demonstram um movimento do pico de excitação em direção à região do vermelho, quando comparado ao pico de absorção obtido. Isso ocorre possivelmente devido à presença de diferentes conformações da mesma molécula nas soluções, produto de um “conformer”, tautômero ou tautomerização. O “conformer”, ou seja, a molécula em sua forma básica elaborada pelo laboratório fabricante, geralmente representa 95% do composto em uma solução, os 5% restantes podem tomar diferentes formas devido a isomeria. A isomeria é o tipo de fenômeno (forma da molécula) na qual dois isômeros, em solução coexistem segundo um equilíbrio dinâmico, ocorrendo migração de um átomo de hidrogênio na molécula alterando sua forma. Esta alteração na forma da molécula básica pode ocorrer de duas

maneiras, simplesmente tomando uma forma diferente (tautômero), ou após a excitação da molécula submetida a uma grande carga energética, neste caso denominado tautomerização (MORAES, 1975).

Em suma, observando todos os resultados obtidos no presente estudo pode-se inferir que a porção do ATP reativa à luz é a adenina, e que esta sofre influência da cadeia de fosfatos sobre sua reatividade. Os subsídios para a sugestão desta influência foram obtidos a partir de modificações de pH e densidade do meio. Contudo, estudos futuros são necessários para verificar como a luz modifica a conformação da molécula de ATP. Resultados obtidos no presente estudo, associados a estudos prévios de Amat et al. (2006), podem nortear princípios básicos na interação luz sobre a reatividade da molécula de ATP em sistemas “*in vitro*” e “*in vivo*”.

6 Conclusões

Através da caracterização espectroscópica (200-800 nm) da molécula de ATP e seus derivados em meio aquoso pode-se concluir que o pico de absorção da molécula de ATP e derivados (ADP, AMP, adenosina e adenina) ocorre em 260 nm. O que nos levou a conclusão de que a parte da molécula responsável pela absorção de luz é a adenina (presente em todos os compostos). Com a excitação em 260 nm, existe alta intensidade de fluorescência da molécula de ATP quando comparado a seus derivados. Esta fluorescência acentuada do ATP, sobre os derivados, se dá devido à influência da cadeia de fosfatos e sua interação com a adenina. Também, foi possível concluir com este estudo que existe forte influência do pH e da densidade do meio sobre as reações supracitadas, não tendo sido observado em estudos prévios.

Referências

- AMAT, A. et al. Effect of red and near-infrared laser light on adenosine triphosphate (ATP) in the luciferine–luciferase reaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v.168, p. 59–65. 2004.
- AMAT, A. et al. Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.81, p. 26–32. 2005
- AMAT, A. et al. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.82, p. 152–160. 2006.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry** 5.ed. New York. :W.H. Freeman and Company, 2002.
- BEYER, H.; WALTER, W.; LLOYD D. **Organic Chemistry**. Chichester: Albion Publishing. 1997. 1037 p.
- BYRNES ,K.R.; WAYNANT, R.W.; ILEV, I.K.; WU ,X.; BARNA, L.; SMITH, K.; HECKERT ,R.;GERST ,H.; ANDERS J.J. Light alters the immune response after acute spinal cord injury. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 36, n.3, p. 171-185. 2005.
- DAVIS, J. R.; MORRIS, R.N.; **Rapid colorimetric determination of adenine compounds. Analytical Biochemistry**. v. 5, n. 1, p. 64-69, 1963.
- FRIEDRICH, T.; BOTTCHEER, B. The gross structure of the respiratory complex I: a Lego system. **Biochemistry and Biophysics Acta**. v.1608, n.1, p. 1-9, 2004.
- HU, W. P.; WANG, J. J.; YU,C. L.; LAN, C. C.; CHEN, G. S.; YU H. S. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **Journal of Investigative Dermatology**. v.127, n. 8, p. 2048-2057, 2007.
- KALCKAR, H.M. 50 years of biological research-from oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation. **Annual Review of Biochemistsry**. v.60, p. 1-37, 1991.
- KARU T.; PYATIBRAT L. ; KALENDO G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.27, p. 219-223, 1995.
- KARU T. et al. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.18, p. 171-177, 1996.
- KARU T. et al **The Science of Low-Power Laser Therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers. 1998. 327 p.

KARU T. et al. Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.49, p.1-17. 1999.

KARU T.; PYATIBRAT L.; AFANASYEVA N. I.; A Novel Mitochondrial Signaling Pathway Activated by Visible-to-near Infrared Radiation, **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v.80, p. 366–372, 2004.

KASSAK, P. et al. Mitochondrial Alterations Induced by 532 nm Laser Irradiation. **General Physiology and Biophysics**. v.24, p. 209-220, 2005.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, New York: Plenum Press. 1983. 526 p.

LEHNINGER A. L.; NELSON D.L.; COX M. M.; **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Editora Sarvier. 2002. 975p

MANTEIFEL, V. M.; KARU, T. I.; Structure of Mitochondria and Activity of Their Respiratory Chain in Successive Generations of Yeast Cells Exposed to He–Ne Laser Light, **Biology Bulletin**. v. 32, n. 6, p. 556–566, 2005.

MORAES, R. **Química orgânica – terceiro ano do segundo grau**. São Paulo: Editora Saraiva. 1975. 413 p.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N.; BOYD, R. K., **Organic Chemistry**. 6. Ed. Englewood Cliffs. 1992. 467p.

ODIJK, T. Long-Range Attraction in Polyelectrolyte Solutions. **Macromolecules**. v.27, p. 4998-5003, 1994.

ORON U.; ILIC S.; DE TABOADA L.; STREETER J.; Ga-As (808 nm) laser irradiation enhances ATP production in human neuronal cells in culture, **Photomedicine and Laser Surgery**. v.25, n. 3, p.180-182, 2007.

PERKIN ELMER. An Introduction of Fluorescence Spectroscopy. 1 Ed. Buckinghamshire: PerkinElmer Ltd. 2000. 36 p.

POUCHERT, C.J. **The Aldrich Library of infrared Spectra**. 3 Ed. Milwaukee: Aldrich Chemical Company. 2000. 1981 p.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound repair and regeneration**. v. 9, n. 3, p. 248-255, 2001.

REES, D.C.; HOWAR, J.B. Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. **Journal of Molecular Biology** v. 293, p, 343-350, 1999.

RIGAU I MAS J. **Acción de la luz laser a baja intensidad en la modulación de la función celular.** 1996. 208f Tese (Doutorado em Medicina) - Universitat Rovira i Virgili. Reus, España, 1996.

SANTHOSH, C. . MISHRA, , P. C. Electronic spectra of adenine and guanine: Assignments and effects of solution environment. **Journal of Chemical Sciences.** v. 104, n.6, p. 649-660. 1992.

SCHILLING, C.H.; LETSCHER, D.; PALSSON ,B.O. Theory of the systemic definitioin of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. **Journal Theoretical Biology.** v. 203, p. 229-248, 2000.

WILLIAMS, A. T. R., **Fluorescence detection in liquid chromatography.** 1 ed. Buckinghamshire: Pelkin-Elmer limited. 1980. 45 p.

Anexo A – Certificação experimental

Michal Heger
Laser Center
Academic Medical Center
University of Amsterdam
Meibergdreef 9
1105 AZ Amsterdam
The Netherlands
T.: +31 (0)20 566 7419
E-mail: M.Heger@amc.uva.nl



Academisch Medisch Centrum
Universiteit van Amsterdam

Amsterdam, September 17th 2007

Re: certificate of achievement Jorge Luiz Reis de Oliveira

To whom it may concern:

This is to certify that Mr. Jorge Luiz Reis de Oliveira, born on March 26th 1984 in São José dos Campos, has performed research on behalf of the Laser Center, Academic Medical Center, University of Amsterdam on the topic of low level laser therapy, and in particular on the spectroscopic behavior of ATP and derivatives in aqueous medium, in the period of 4 July 2007 thru 20 September 2007. Out of a total of 360 hours spent on research during this period, 60 hours were allocated towards low level laser therapy-related topics (irradiation of ATP at non-resonant optical frequencies), and 300 hours were allocated towards absorption and fluorescence spectroscopy of ATP and derivatives.

Michal Heger
Supervisor

Prof. Dr. Martin J.C. van Gemert
Director of Laser Center