

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
UNIVERSIDADE REGIONAL COMUNITÁRIA DE CHAPECÓ
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

JULIANA WAGNER POTRICH

**EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER GaAlAs NA
ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

São José dos Campos, SP
2008

Juliana Wagner Potrich

Efeito da Irradiação Laser GaAIs na Atividade Enzimática

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, dentro do curso de Mestrado Interinstitucional Univap / Unochapecó

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

São José dos Campos, SP
2008

P892e

Potrich, Juliana Wagner

Efeito da irradiação laser GaAlAs na atividade enzimática / Juliana Wagner Potrich; Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva.-- São José dos Campos; Chapecó, 2008.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, modalidade Minter Univap / Unochapecó. 2008.

1. Lasers 2. Atividade Enzimática 3. Alfa-amilase 4. Lasers de Arseneto de Galio e Alumínio I. Silva, Newton Soares da, Orient. II. Título

CDU:577.15

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.

Aluno: *Juliana Wagner Potrich*

São José dos Campos, 13 de outubro de 2008

JULIANA WAGNER POTRICH

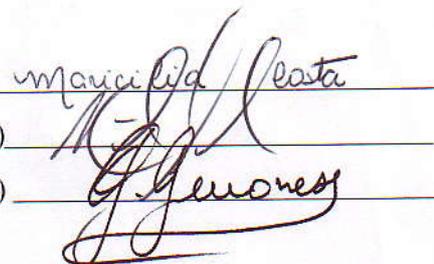
“EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER GaAlAs NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA”

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:

Prof^ª. Dra. **MARICÍLIA SILVA COSTA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **WALTER JOÃO GENOVESE** (UNICSUL)



Prof^ª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 13 de outubro de 2008.

Dedico à meus Pais, José Antônio e Cleusa, Meus Irmãos Fernando e Daniel, Vó Adélia e Tia Vera, Vô Valter e Vô Terezinha, meus incentivadores e exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde.

Ao professor Newton, meu orientador. Muito obrigada pelo incentivo, paciência, carinho e dedicação.

A Silvana, minha colega e amiga por toda ajuda e conhecimento que dividiu comigo sem medir esforços, muito obrigada!

As minhas amigas e colegas Adriana e Alcimara pela grande amizade e por tornar nossas viagens muito divertidas!!

As monitoras do laboratório de bioquímica da UNOCHAPECÓ, Adriana e Débora, obrigada pela colaboração.

A todos os colegas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora de beleza do reino e espírito, para o seu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade a qual seu futuro trabalho pertencer”.

(Albert Einstein)

EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER GaAlAs NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

RESUMO

Enzimas são proteínas especializadas que catalisam reações biológicas. Praticamente todas as reações que ocorrem em uma célula requerem a ação de uma enzima porque essas reações não ocorreriam nas condições físicas (pH, temperatura e ambiente) da célula. Os efeitos da irradiação do laser de baixa potência sobre a atividade enzimática têm sido investigados, e como consequência da irradiação, variações das propriedades ópticas, das afinidades das ligações à coenzima e dos parâmetros cinéticos tem sido estudados por diversos autores. Neste trabalho foi utilizado o laser de baixa potência GaAlAs 904 nm e densidades de energia de 0,01, 0,1, 0,5 e 1 J/cm², tendo como objetivo avaliar a atividade da a-amilase quando irradiada com o laser. Foram utilizados 2 grupos para o experimento (i) Grupo controle: enzima + substrato e (ii) Grupo irradiado: enzima + laser + substrato. Para o grupo 2 foram realizadas 4 irradiações com laser GaAlAs de dosagens crescentes (DE 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 J/cm²) sendo que para cada irradiação foram realizadas 6 repetições. Dois parâmetros foram utilizados para analisar os resultados. O teste T e percentual enzimático. A fotomodulação da atividade da a-amilase pela irradiação com laser GaAlAs resultou em diferenças estatisticamente significativas na atividade enzimática: 0,01 J/cm² (0,10%), 0,1 J/cm² (13,44%), 0,5 J/cm² (12,57%) e 1 J/cm² (- 6,10%), concluindo assim que a irradiação com laser de baixa potência teve influencia sobre a atividade da a-amilase.

Palavras-chave: Enzimas. LBP. Atividade enzimática.

EFFECT OF GaAIAs LASER IRRADIATION ON ENZYMATIC ACTIVITY

ABSTRACT

Enzymes are specialized proteins that catalyze biological reactions. Practically all reactions that occur in a cell require the action of an enzyme, because these reactions would not occur in the physical cell conditions (pH, temperature and environment). The effects of low-power laser irradiation on the enzymatic activity has been strongly investigated and, as a consequence of irradiation, variations in the optical properties, connections affinity to the coenzyme and kinetic parameters has been studied by several authors. In this work it was used the low-power laser GaAIAs 904nm and energy densities of 0,01, 0,1, 0,5 and 1 J/cm², and the work has as objective evaluate the a-amylase activity when it is irradiated with laser. Two groups were used for the experiment; (i) Control Group: enzyme + substrate and (ii) Irradiated Group: enzyme + laser + substrate. To the group 2, four irradiations with GaAIAs laser of crescent doses (DE 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 J/cm²) were used, and for each irradiation 6 repetitions were done. To analyze the results, two parameters were used: the T test and enzymatic perceptual. The photomodulation of the a-amylase activity through the irradiation with GaAIAs laser resulted in statistically significant differences in the enzymatic activity: 0,01 J/cm² (0,10%), 0,1 J/cm² (13,44%), 0,5 J/cm² (12,57%) and 1 J/cm² (- 6,10%), concluding, therefore, that the irradiation with low-power laser had influence on the a-amylase activity.

Key-Words: Enzymes. LLLT. Enzymatic Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:Espectro eletromagnético	24
Figura 2: Caminhos celulares que podem ser ativados quando a luz laser interagir com ATP, Na ⁺ /K ⁺ ATPase, mitocôndrias, enzimas e fosfolipídeos de membrana que regulam sinais de Ca ²⁺ (legenda: ATP*,ATP estimulado pela luz; enzimas estimuladas pela luz*). Tradução: Juliana Wagner Potrich.	33
Figura 3: Amilase CNPG Liquiform (Labtest Diagnostica S.A.) – sistema para determinação	34
Figura 4: Soro controle (Qualitrol 1H – Labtest Diagnostica S.A.) – preparação liofilizada em matriz	35
Figura 5: Laser diodo GaAlAs (Endophoton LLT 0107).	36
Figura 6: Técnica de aplicação do laser GaAlAs sobre as amostras.	38
Figura 7: Espectrofotômetro BTS 310 Bio System.	39
Figura 8: “ <i>In vitro</i> ” atividade enzimática média da a-amilase para cada dose de irradiação seguida do percentual em relação à atividade do tratamento controle.	42
Figura 9: “ <i>In vitro</i> ” atividade enzimática média da a-amilase e respectivo intervalo com 95% de confiança pelo teste t, para cada dose de irradiação avaliada.	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Valores médios da atividade da enzima α -amilase submetida a irradiação com laser de GaAlAs, comprimento de onda 904 nm, potência 50mW, no modo pulsado (2Hz). 41
- Tabela 2: Relação da concentração da atividade da α -amilase irradiada com laser GaAlAs... 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus centígrados

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

cm – Centímetros

CNP - 2-cloro-4-nitrofenol

CO₂ – Dióxido de carbono

DE – Densidade de energia

dL – Decilitro

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP – Densidade de potência

E – Enzima

ES = concentração enzima + substrato

EP = concentração enzima + produto

ESL – Enzima + Substrato + Laser

GaAs – Arseneto de Gálio

GaAlAs – Arseneto de Gálio e Alumínio

GABA - Ácido γ-aminobutírico

GAD – Glutamato decarboxilase

Gal-G2-a-CNP - α(2-cloro-4-nitrofenil)-β-1,4- galactopiranosilmaltoside

Gal-G2 - 1,4 – galactopiranosilmaltoside

GOT – Transaminase glutâmica oxalacética

GTP – Transaminase glutâmica pinúvica

He-Ne – Hélio e Neônio

HILT – High Intensity Laser Therapy

Hz – Hertz

IP₃ – Inositol Trifosfato

J – Joules

J/cm² – Joules por centímetros quadrados

Kcat – Constante da velocidade de reação

Km – Constante de Michaelis-Menten

Ks – Constante de equilíbrio para dissociação do complexo enzima substrato

LAP – Laser de Alta Potência

LBP – Laser de Baixa Potência

LLLT – Low Level Laser Therapy (Terapia Laser de Baixa Intensidade)

LPS – Perfil Temporal do efeito da injeção intravenosa de lipopolissacarídeo de bactéria Gram- negativa

Mg - Miligramas

mL – Mililitros

mmol/L – Milimol por litro

mW – Miliwatts

mW/mm² – Miliwatts por milímetros quadrados

NADPH - Nicotinamida adenosina dinucleotído fosfato

nm – Nanômetros

P – Produto

PIP₂ – Fosfatidil Inositol Difosfato

PGS₂ – Prostaglandinas

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucléico

s – Segundos

S – Substrato

Teste T - Student

TXA₂ – Tromboxano A₂

TLBP – Terapia Laser de Baixa Potência

U/I – Unidade catalítica internacional

U/L – Unidades por litro

UV - Ultravioleta

V – Volts

W – Watts

a - alfa

? – Comprimento de onda

μ L – Microlitros

μ m – Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Enzimas	18
3.1.1 a-amilase.....	20
3.1.2 Ligação de substrato pela enzima	21
3.1.3 Fatores que influenciam a velocidade das reações catalisadas por enzimas....	21
3.1.4 Determinação da atividade enzimática.....	22
3.1.5 Unidades de enzima	22
3.1.6 Usos das enzimas como reagentes laboratoriais	23
3.2 A luz laser.....	24
3.2.1 Tipos de laser.....	28
3.2.2 Laser de Baixa Potência e Enzimas	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Reagentes.....	34
4.2 Aparelho laser.....	35
4.3 Grupos experimentais	37
4.4 Espectrofotômetro	38
4.5 Análises estatísticas	39
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores de extraordinária eficiência. Os aumentos de velocidade de reações alcançados por enzimas podem chegar a vinte ordens de magnitude. Por outro lado, enzimas possuem uma grande especificidade pelos substratos, sua atividade é controlável e totalmente seletiva.⁽¹⁾

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas. A maioria das moléculas biológicas é muito estável no ambiente aquoso de pH neutro e temperatura moderada encontrado no interior das células. Muitas reações bioquímicas comuns envolvem eventos químicos que são muito improváveis nas condições do ambiente celular, como a formação transiente de intermediários eletricamente carregados e instáveis ou a colisão de duas ou mais moléculas com a orientação precisa necessária para digerir os alimentos, enviar sinais através dos nervos, ou contrair um músculo, simplesmente não ocorrem em velocidade útil sem catálise.⁽²⁾

Os efeitos da irradiação do laser de baixa potência sobre a atividade enzimática tem sido bastante investigado, e como consequência da irradiação, variações das propriedades ópticas, das afinidades das ligações a coenzima e dos parâmetros cinéticos tem sido estudados por diversos autores.⁽³⁾

A ativação de enzimas pela luz laser é um dos campos que mais crescem hoje em dia e muitas pesquisas tem sido realizadas. A princípio, um fóton pode ativar uma molécula de enzima, o qual uma de cada vez pode processar milhares de moléculas de substratos. Esse extraordinário fator de amplificação pode ser a explicação do porquê a terapia de laser de baixa potência é de fato efetiva. Se o efeito de um fóton pode ser amplificado biologicamente, então não precisa de muitos fótons para produzir um efeito. Apenas necessita encontrar um comprimento de onda de luz apropriado para estimular adequadamente a enzima, a qual por sua vez estimulará efeitos terapêuticos benéficos.⁽⁴⁾

O presente trabalho propõe avaliar o efeito da irradiação laser GaAIs sobre a atividade da α -amilase. A opção pela enzima amilase se justifica pelas seguintes razões:

- Ser facilmente adquirida em amostra comercial;
- Existir substrato facilmente acessível;
- Existir metodologia preconizada para medida de sua atividade;
- Metodologia de rápida e fácil execução com o instrumental disponível;
- Não necessitar de co-fatores para expressar sua atividade (a necessidade de co-fator representaria mais uma variável a ser considerada nos resultados).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a influência da irradiação laser na atividade enzimática.

2.2 Objetivos específicos

- Medir a atividade da enzima α -amilase presente em amostra de soro controle comercial através de método cinético;
- Irradiar com laser de GaAlAs 904 nm, DE 0,01 J/cm²; 0,1 J/cm²; 0,5 J/cm² e 1,0 J/cm² solução aquosa contendo a enzima α -amilase em amostra de soro controle comercial e medir a atividade da mesma através de método cinético;
- Comparar a atividade da enzima α -amilase sob efeito da irradiação laser e sem o efeito da irradiação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Enzimas

Enzimas são proteínas especializadas que catalisam reações biológicas. Praticamente todas as reações que ocorrem em uma célula requerem a ação de uma enzima porque essas reações não ocorreriam nas condições físicas (pH, temperatura e ambiente) da célula.⁽⁵⁾

Um catalisador aumenta a velocidade de uma reação química e pode ser um composto inorgânico ou orgânico. Enzimas são catalisadores eficientes: não só aumentam a velocidade de conversão do substrato em produto, mas também reconhecem um substrato específico em presença de estruturas semelhantes para produzir um produto específico. Há seis classes de enzimas, cada classe catalisando uma reação química diferente. Uma enzima acelera a formação de produto por diminuir a energia de ativação. Esta está relacionada com quanta barreira existe para o substrato se transformar no produto. Mudança de energia de ativação acontece quando a enzima interage com substrato, estabilizando o substrato em uma forma que permitirá formação de produto. Este é chamado estado de transição. Quanto mais estável o estado de transição, menos energia será necessária para conversão de substrato em produto, e mais rápida será a reação.⁽⁶⁾

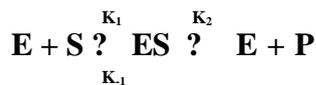
O termo “mecanismo catalítico” é usado para descrever as forças ou interações microscópicas utilizadas pelas enzimas para amplificar a velocidade de reações. Já “mecanismo de reação” é a seqüência de transformações (quebra e formação de ligações químicas) e mudanças de estrutura do complexo enzimático observadas ao longo do progresso da reação.⁽¹⁾

A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos, depois nomeados enzimas, eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos como verdadeira.⁽²⁾

Uma enzima é muito maior do que o substrato, e a parte da enzima onde o substrato se liga é chamada sítio ativo. A velocidade com que uma enzima converte substrato em produto pode ser descrita pela equação Michaelis-Menten, na qual um termo K_m , está relacionado com a afinidade do substrato pela enzima (K_m alto: representa baixa afinidade do substrato pela enzima e K_m baixo: representa alta afinidade do substrato pela enzima), K_{cat} , está relacionado com quão rapidamente a enzima converte o substrato em produto.⁽⁶⁾

• **Equação de Michaelis – Menten (Descrição Macroscópica)**

As Equações de Michaelis-Menten são o modelo básico usado para descrever cinética enzimática para um único substrato, S. Em 1913, Michaelis-Menten conceituaram a formação do complexo enzima-substrato (ES), em termos de derivação matemática, através da seguinte equação:



Onde k_1 , k_2 e k_{-1} são constantes específicas de velocidade para as reações designadas:

k_1 - constante da velocidade para formação do complexo enzima-substrato (ES)

k_2 - constante da velocidade para conversão do complexo ES em produto (P) e a liberação subsequente do produto da enzima

k_{-1} - constante da velocidade para a reação reversa, dissociação do complexo ES para liberar enzima e substrato

E = concentração da enzima

S = concentração do substrato

P = concentração do produto

ES = complexo enzima + substrato

K_m é chamada constante de Michaelis-Menten ou constante da cinética enzimática, que é característica do estado de equilíbrio dinâmico e não tem qualquer significado em outra situação cinética.^(7,8)

Esta equação evidencia dois pontos importantes, o primeiro, é que a enzima que participa de uma reação química não sofre nenhum tipo de modificação química ou estrutural,

sendo completamente regenerada ao final da mesma, e o segundo está relacionado ao sentido das flechas, indicando que a maioria das reações enzimáticas pode ser revertida pela ação da mesma enzima.⁽⁶⁾

Existe, porém, um grupo de enzimas cujas propriedades cinéticas não podem ser explicadas pelo modelo proposto por Michaelis-Menten. Estas enzimas são chamadas de enzimas alostéricas e possuem sítios adicionais, chamados sítios alostéricos, que regulam a atividade catalítica. Frequentemente sua ligação leva a enzima a mudar sua estrutura tridimensional para se tornar mais ou menos eficiente como catalisador. Estas enzimas costumam ter suas velocidades alteradas por moléculas que se ligam a locais diferentes do sítio ativo, garantindo desta forma, sua regulação. Uma via metabólica que envolve várias enzimas normalmente tem uma etapa que limita sua velocidade de reação, esta etapa é catalisada por uma enzima alostérica.^(6,8)

As enzimas ainda podem sofrer a ação de inibidores. Um inibidor é uma substância que interfere na ação de uma enzima e desacelera a velocidade de uma reação. Há duas formas nas quais os inibidores podem afetar uma reação enzimática. Um inibidor reversível que pode se ligar a enzima e ser liberado em seguida deixando-a em sua condição original. E também podem ser diferenciados em inibidores competitivos e não-competitivos, sendo diferenciados com base nos sítios na enzima a qual se ligam. Um inibidor irreversível reage com a enzima produzindo uma proteína que deixa de ser enzimaticamente ativa de tal forma que a enzima original não pode ser regenerada.⁽⁷⁾

3.1.1 a-amilase

A amilase provém de duas fontes principais: pâncreas e glândulas salivares. É secretada no trato intestinal por meio do ducto pancreático. As glândulas salivares secretam a amilase que inicia a hidrólise do amido presente nos alimentos na boca e no esôfago. Esta ação é desativada pelo conteúdo ácido do estômago. No intestino, a ação da amilase pancreática é favorecida pelo meio alcalino presente no duodeno. A atividade amilásica também é encontrada no sêmen, testículos, ovários, tubos de Falópio, músculo estriado, pulmões e tecido adiposo.⁽⁷⁾

Amido (ou glicogênio) ? a-amilase ? maltose + dextrina

A atividade da amilase salivar também pode ser utilizada como um excelente indicador para o estresse fisiológico. Quando a atividade da amilase salivar é monitorada, as glândulas salivares não só atuam como um amplificador dos baixos níveis de norepinefrina (neurotransmissor que regula a secreção de amilase salivar), mas também responde mais rapidamente e com maior sensibilidade ao estresse psicológico que o cortisol.⁽⁹⁾

3.1.2 Ligação de substrato pela enzima

Em uma reação catalisada por uma enzima, a enzima liga-se ao substrato (um dos reagentes) para formar um complexo. A formação do complexo leva a formação das espécies do estado de transição, que podem, então, formar o produto.⁽⁶⁾

O modelo chave-fechadura e o modelo do ajuste induzido, são dois modelos importantes desenvolvidos para descrever o processo de ligação entre enzima e substrato. O modelo chave fechadura supõe um alto grau de semelhança entre o formato do substrato e a geometria do sítio de ligação na enzima. O modelo do ajuste induzido, leva em conta o fato de que as proteínas têm alguma flexibilidade tridimensional. A ligação do substrato induz a uma mudança conformacional na enzima que resulta em um encaixe complementar depois que o substrato é ligado.⁽⁶⁾

3.1.3 Fatores que influenciam a velocidade das reações catalisadas por enzimas

· **Temperatura:** Embora a elevação da temperatura aumente a velocidade de uma reação catalisada por enzima, isso ocorre somente numa faixa muito limitada de temperatura. A velocidade da reação, inicialmente, cresce quando a temperatura se eleva, devido ao aumento da energia cinética das moléculas reagentes. Eventualmente, porém, a energia cinética da enzima supera a barreira de energia para romper as fracas ligações de hidrogênio e as ligações hidrofóbicas que mantêm a sua estrutura secundária-terciária.

Resumindo, a influência da temperatura em uma reação enzimática pode ser de dois tipos:

1. Aumento da velocidade com o aumento da temperatura = a velocidade de reação aumenta com a temperatura, até um pico de velocidade ser atingido. Esse aumento é devido ao aumento do número de moléculas com energia suficiente para atravessar a barreira de energia e formar os produtos da reação.

2. Diminuição da velocidade com o aumento da temperatura = uma elevação maior da temperatura resulta em redução na velocidade da reação, como resultado da desnaturação da enzima, induzida pela temperatura.

· **pH:** quando a atividade enzimática é medida em vários valores de pH, observa-se geralmente uma atividade máxima em valores de pH, entre 5.0 e 9.0. Algumas enzimas, contudo, como a pepsina, são ativas em valores de pH bastante afastados dessa faixa.^(2,6)

3.1.4 Determinação da atividade enzimática

Os métodos mais utilizados na rotina do laboratório de Bioquímica Clínica são:

· **Método de ponto final:** mede a atividade da enzima baseado apenas nos pontos inicial e final da reação. Não se considera o que acontece durante a reação. É pouco preciso.

· **Método cinético:** avalia a reação enzimática em vários pontos sendo, portanto mais preciso e sensível que o método de ponto final. É o método mais utilizado na atualidade.⁽²⁾

3.1.5 Unidades de enzima

A cinética de uma enzima é estudada avaliando-se a quantidade de produto formado

ou a quantidade de substrato consumido por unidade de tempo de reação, e não através da relação massa volume (concentração), utilizada como parâmetro de medida e avaliação para a grande maioria dos elementos sanguíneos de interesse clínico-laboratorial.

Duas são as unidades mais utilizadas para a medida da atividade enzimática ou catalítica.

- **Unidade Catalítica Internacional (U ou U.I.):** corresponde a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de substrato por minuto, em condições ótimas específicas para cada enzima. É a unidade de enzima mais utilizada atualmente na prática clínico-laboratorial.

- **Katal:** unidade expressa em mol por segundo, e corresponde a atividade catalítica necessária para, em condições ótimas pré-definidas, transformar um mol de substrato em produto por segundo de reação.^(2,6)

3.1.6 Usos das enzimas como reagentes laboratoriais

Na prática laboratorial, as enzimas são também muito utilizadas como reagentes altamente específicos e sensíveis em reações quantitativas através de métodos enzimático-cinéticos e enzimático-colorimétricos de ponto final. Estes kits comerciais, rotineiramente usados em laboratórios para dosagens bioquímicas, utilizam uma proporção entre os reagentes (substratos e enzimas) baseados no K_m de cada enzima, de modo que a reação proposta pelo fabricante do kit atinja a velocidade máxima no menor tempo possível. Nestes casos a metodologia utiliza-se de uma enzima específica e de um reagente de cor para evidenciar, através da medida fotométrica da intensidade de cor de um produto final, a concentração geralmente expressa em mg por dL) de um determinado analito (glicose, colesterol, triglicerídeos, uréia, ácido úrico). É evidente que esta velocidade dependerá também das outras variáveis anteriormente citadas, como a temperatura e o pH do sistema em questão, que deverão obrigatoriamente permanecer constantes do início ao fim da reação, condição esta assegurada através do uso de equipamentos (fotômetros, espectrofotômetros) dotados de cubeta termostaticada, e também através da adição de tampões (fosfato, bicarbonato) a

composição final dos kits.

3.2 A luz laser

O termo laser é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. É uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou não, dependendo da matéria que produz este tipo de radiação.^(10,11) É também um dos métodos mais antigos usados pela humanidade (historicamente como terapia solar pelos egípcios), mais tarde como terapia UV para o qual Nils Finsen ganhou prêmio Nobel em 1904.⁽¹²⁾

A laserterapia de baixa potência tem sido investigada e utilizada na prática clínica há aproximadamente 20 anos, sendo que os trabalhos iniciais foram realizados na Europa por Mester, no início da década de 70. O crescente interesse pelos efeitos do laser tem sido demonstrado pela significativa quantidade de publicações científicas, por meio de experimentos controlados em animais e humanos.⁽¹³⁾

Sendo uma forma de emissão estimulada, o laser está englobado dentro de um espectro eletromagnético, que vai de raios X até a microonda (figura 1) e se difere da luz de uma lâmpada comum pelas suas características de monocromaticidade, colimação e coerência.^(14,15)

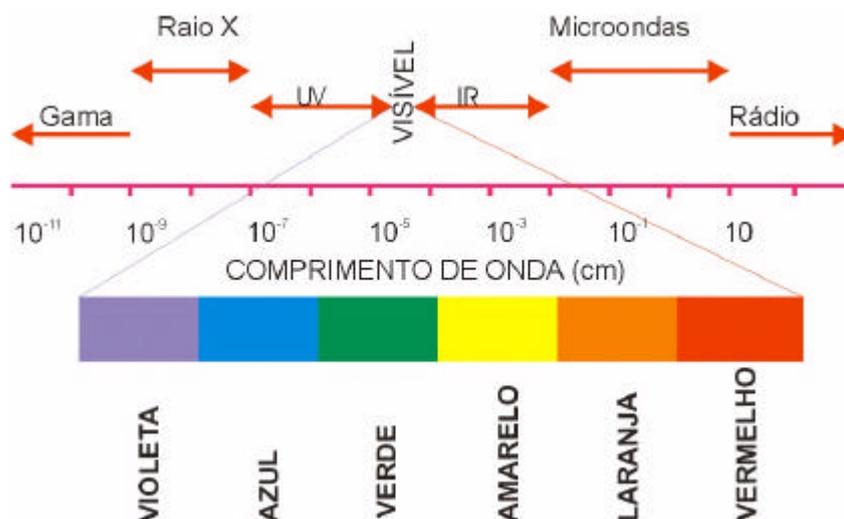


Figura 1: Espectro eletromagnético

A monocromaticidade indica que cada meio que gera laser corresponde a um único comprimento de onda. A luz laser é uma luz pura, composta por fótons da mesma cor e com o mesmo comprimento de onda. Esta característica é considerada o atributo mais importante da luz laser, porque determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente e, portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos específicos. A colimação refere-se ao grau de paralelismo do feixe laser, mantendo um pequeno tamanho da saída do feixe numa distância relativamente grande laser. A coerência é uma das principais propriedades do laser, que a distingue de outras formas de luz, caracterizada pela sincronicidade das ondas de luz.^(11,16,17)

Nas ciências da saúde o uso de Laser de Baixa Potência ocorre devido aos fenômenos: reflexão, transmissão, absorção e espalhamento em um sistema biológico. Esses fenômenos possuem características distintas, e dependem dos comprimentos de onda do laser e de sua interação com os tecidos biológicos. Os parâmetros físicos da irradiação laser são: potência, irradiância (densidade de potência), energia, densidade de energia (fluência). A potência de um aparelho é comumente expressa em miliwatts (mW). A irradiância é a relação entre potência administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio ou spot. O cálculo da irradiância depende da área de saída do feixe laser. A energia dos raios pulsáveis é descrita em joules (J), e corresponde a potência entregue em um determinado período de tempo. A densidade de energia é a relação entre a energia administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio de luz laser ou spot e é expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm^2).⁽¹⁸⁾

Os lasers podem ser classificados em: Lasers de Baixa Potência (LBP), potência < 1 W (lasers não-cirúrgicos ou LLLT – *Low Level Laser Therapy*) e Lasers de Alta Potência (LAP), potência > 1 W (lasers cirúrgicos ou HILT – *High Intensity Laser Therapy*).⁽¹⁵⁾

A parte do espectro mais comumente utilizada na prática da terapia com laser de baixa potência varia do comprimento de onda 630 nm a 1300 nm. O meio laser consiste de um conjunto apropriado de elétrons, moléculas, íons e em alguns casos um cristal semiconductor. O processo de bombeamento é utilizado para excitar os átomos para um nível quântico energético mais alto. Estabelecendo entretanto a condição de inversão da população, na qual tem-se mais átomos excitados em um determinado nível quântico de energia do que em outro nível quântico inferior.⁽¹⁹⁾

Devido as suas propriedades diferenciais, a luz laser possui utilidades terapêuticas importantes (Laser de Baixa Potência ou laser Terapêutico), assim como ser utilizado em cirurgias com vantagens superiores ao uso do bisturi convencional. Por exemplo, fazendo com que ocorra hemostasia durante o procedimento cirúrgico (Laser Cirúrgico ou de Alta Potência). O Laser de Baixa e de Alta Potência possuem suas radiações ópticas com as mesmas características, porém com finalidades específicas.^(15,20)

A terapia laser de baixa potência é utilizada na fisioterapia, na odontologia (para tratar inflamações da mucosa oral e ulcerações), na dermatologia (edemas, queimaduras e dermatites), reumatologia (doenças autoimunes, inflamações crônicas) e outras especialidades. Podendo também ser utilizada na medicina veterinária, na ortopedia, na medicina desportiva e clínicas de reabilitação.^(17,21)

Os Lasers de Baixa Potência causam fotoativação celular, também chamada de fotomodulação, determinada pelos efeitos fotoquímicos e fotoelétricos ou fotofísicos causados pelo laser. Os principais efeitos gerados nos tecidos têm natureza estimulatória, causando aumento do metabolismo celular, quimiotaxia e vascularização, entre outros.⁽¹⁵⁾ Já os lasers de alta potência causam destruição e vaporização de tecidos, sendo assim muito explorados em cirurgias, e envolvem efeitos térmicos, como fotocoagulação, fotovaporização e fotoablação, além de fenômenos fotoquímicos e fotofísicos.^(11,22)

O efeito fotobiológico gerado pelo LBP ocorre estimulando a síntese de ATP, de colágeno, proliferação celular dentre outros eventos celulares. Desta forma, podem ocorrer efeitos analgésicos, antiinflamatórios e reparadores. Porém, estes efeitos dependem de fatores como comprimento de onda do laser, dose e tempo de aplicação.^(23,24,25,26)

Os principais efeitos bioquímicos apresentados pelo LBP são: a liberação de substâncias pré-formadas, como histaminas, serotonina e bradicinina, e modificações das reações enzimáticas, que proporcionam alterações estimulantes ou inibitórias as enzimas como inibição de ciclooxigenases impedindo assim a formação de prostaglandinas e lise de fibrina.^(27,28)

O efeito bioelétrico é explicado pelo estímulo a produção de ATP (adenosina

trifosfato) e aumento da mobilidade iônica, levando a potencialização da bomba de sódio e potássio, promovendo então o efeito bioestimulante do laser.⁽²⁹⁾

Esses efeitos, por não serem visíveis a olho nu, são até hoje, muito discutidos, e alguns modelos já foram propostos na literatura na tentativa de desvendar o que de fato ocorre no tecido quando essa irradiação laser é utilizada. Porém, algumas explicações foram propostas para desvendar a interação entre a luz laser e as células:

1. Olson, Schimmerling e Tobias⁽³⁰⁾, sugeriram que a absorção primária de luz pelas enzimas mitocondriais resulta em aquecimento local decorrente de um aumento da vibração molecular.

2. Karu⁽³¹⁾, em 1987 propôs um modelo que sugeriu que ocorreriam mudanças, fotoquímicas em moléculas fotorreceptoras componentes da cadeia respiratória celular. Como resultado de fotoexcitação de estados eletrônicos, ocorreriam os seguintes fenômenos físicos e/ou químicos: aceleração na transferência de elétrons, e mudanças na atividade bioquímica que causariam mudanças na atividade redox da mitocôndria.

3. Smith⁽³²⁾ propôs que a irradiação no infra-vermelho poderia ativar diretamente os canais de Ca^{+2} das membranas celulares através de modificações fotofísicas, desta forma induzindo o influxo de Ca^{+2} e proliferação celular.

Alguns desses caminhos podem ser influenciados simultaneamente pela irradiação LBP e contribuir para as respostas biológicas observadas.⁽²⁷⁾

Na terapia com laser de baixa potência, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas sim, nos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e nos tecidos, fazendo então com que essa energia possa orquestrar mudanças nas moléculas, que por sua vez promoveriam respostas biológicas.^(33,34)

Assim, a terapia com laser de baixa potência produz efeitos não térmicos ou melhor, produz um pequeno e não significativo aumento na temperatura, que não supera um grau centígrado.⁽³¹⁾ É uma modalidade terapêutica atérmica e seus efeitos sendo de fotobiomodulação por laser.⁽³⁵⁾ Portanto todos os autores chegam à conclusão de que essa

mínima mudança não determina os efeitos biológicos do laser.^(36,37)

A bioestimulação ou reações laser catalisadas refere-se à aplicação de energia eletromagnética pelo laser de baixa potência aos tecidos do corpo, o qual pode influenciar as funções celulares, tais como, estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. A magnitude do efeito é dependente do comprimento de onda, das doses e da dose-intensidade do laser.^(38,39,40)

Pode-se dizer então que os efeitos da irradiação laser dependem do comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência e tempo de exposição^(25,50). Pequenas doses de irradiação estimulam, grandes doses de irradiação deprimem processos fisiológicos e extremas doses causam destruição de estruturas biológicas. Irradiações na região do vermelho e infra-vermelho aumentam processos metabólicos nas células e ativam a proliferação. Os principais fotorreceptores nas células são os componentes da cadeia respiratória (desidrogenases, citocromos, citocromos e oxidase). A absorção de luz por esses componentes causam uma pequena ativação térmica na cadeia respiratória e oxidação do NADPH. Isto leva a mudanças no estado de redox da mitocôndria. Um aumento nos íons hidrogênio e na concentração de ATP intracelular de células eucarióticas causam ativação na Na⁺, K⁺ - ATPase, o qual influencia na proliferação celular.⁽²⁵⁾

A irradiação do laser de baixa potência produz ainda efeitos indiretos, como o estímulo da microcirculação produzindo uma vasodilatação que beneficia a troficidade local pelo aumento do aporte de oxigênio e eliminação de catabólitos, e favorece também, o aporte de elementos defensivos, daí deduz-se sua capacidade anti-inflamatória.^(14,41)

3.2.1 Tipos de laser

O tipo de laser é determinado pelo comprimento de onda da luz utilizada, e pelo meio ativo (constituído por materiais que podem produzir a radiação laser). Os meios são classificados em sólido, gasoso, líquido.^(11,19)

O comprimento de onda é o parâmetro em que a comunidade que estuda LLLT (*Low*

Level Laser Therapy) mais concordam entre si. Os comprimentos de onda de 600-700 nm são utilizados para tratar tecidos superficiais e comprimentos de onda entre 780 e 950 nm são escolhidos para tecidos mais profundos devido à longa distância de penetração óptica ao longo do tecido. Comprimentos de onda entre 700 e 770 nm não possuem muita atividade.⁽¹²⁾

Segundo Karu *et al.*⁽²³⁾, os comprimentos de onda 415, 633, 650 e 725 nm são eficientes para aumentar a produção de energia celular, enquanto que com o comprimento de onda de 477, 511, 577 nm não influenciam este processo. Além disso, os autores citam que a fase do ciclo celular da célula irradiada, o comprimento de onda e a frequência da radiação utilizada também influenciam o efeito da terapia.

A interação de fótons com átomos e com elétrons em várias órbitas se dá principalmente pelos processos de absorção, emissão espontânea e emissão estimulada. Um fóton pode ser absorvido por um átomo e, em consequência, um elétron passa de uma órbita para outra, de energia maior. O processo de absorção ocorre quando há diferença entre a energia do estado final menos a energia do estado inicial do fóton. Diversos materiais possuem diferentes estruturas de órbitas, portanto, irradiam fótons de diferentes comprimentos de onda. Quando um elétron é estimulado a passar de uma órbita para outra, por um fóton, esse processo é chamado de emissão estimulada. Os fótons que estimulam a transição e os fótons emitidos pelo átomo são coerentes, isto é, têm energia, frequência, comprimento de onda e fases iguais e a mesma direção de propagação.⁽⁴²⁾

Há dois tipos básicos de lasers, o de impulsos e o de emissão contínua. A diferença entre eles é que o primeiro fornece uma certa energia em um tempo muito pequeno, com uma potência extremamente alta, e o segundo, vai emitindo sua energia aos poucos, com uma intensidade muito menor. Nos lasers a impulsos (material de estado sólido), a emissão se dá através da energia acumulada nos átomos de um rubi, por exemplo, e é liberada em um tempo muito curto. Já nos lasers de emissão contínua (material de estado gasoso) é diferente, a luz é constantemente refletida de um lado para o outro, dentro de um tubo que contém um gás. A cada passagem do feixe de luz, a intensidade aumenta um pouco (se não houver algo que absorva a luz, caso contrário a emissão amortece).^(19,20,43)

Dentro desses tipos básicos de lasers, existem outros tipos mais específicos, que se distinguem segundo o material ativo empregado e o tipo de excitação utilizada para

desencadear o processo. Cada um deles tem uma especificidade para interagir com uma determinada estrutura do organismo.⁽¹⁹⁾

As radiações mais efetivas estão na região do vermelho e infra-vermelho do espectro. Os tipos mais usados são o laser de Hélio-Neônio (He-Ne) (radiação a 632.8 nm), o laser de Gálio-Alumínio (Ga-Al) (630-685 nm) e o laser Arseneto de Gálio (Ga-As) (904 nm). A principal razão para a utilização das radiações na faixa espectral vermelho e infra-vermelho é pelo fato da hemoglobina não absorver nesta região e a luz portanto penetrar profundamente no tecido.^(21,44)

Alguns estudos sugerem ainda que os lasers infravermelhos com comprimentos de onda de 820 a 904 nm (Arseneto de Gálio, Arseneto de Gálio e Alumínio) podem ser mais eficazes para a analgesia, e o Hélio-Neônio para cicatrização.⁽⁴⁵⁾

Exemplos de Lasers quanto a indicações:

- Lasers sólidos

1. Rubi $\lambda = 694$ nm
2. Nd YAG – $\lambda = 1064$ nm. Indicação = pele, dentes

- Lasers a gás

1. HeNe $\lambda = 632.8$ nm. Indicação = bioestimulação
2. Argônio $\lambda = 514$ nm. Indicação = pele
3. CO₂ $\lambda = 10600$ nm. Indicação = pele
4. Excimer $\lambda = 190 - 350$ nm. Indicação = cirurgia vascular

- Lasers semicondutores

1. GaAlAs $\lambda = 904$ nm. Indicação = bioestimulação, lesões causadas por esportes
2. GaAlAs $\lambda = 660 - 904$ nm. Indicação = bioestimulação

- Lasers líquidos

1. DYE $\lambda = 400 - 800$ nm. Indicação = dermatologia.^(11,15)

A terapia a laser exige um conhecimento da energia aplicada, uma investigação dos

efeitos que produz no organismo e, finalmente um modo de aplicação, todos esses elementos somados a uma correta Metodologia de Exame Clínico. Efetuar a radiação laser sem conhecimento das prerrogativas anteriores seria limitar a ação de uma das terapias mais avançadas por sua efetividade.⁽¹¹⁾

3.2.2 Laser de Baixa Potência e Enzimas

Nos últimos tempos, houve um aumento nas aplicações do laser de baixa potência na terapia e em diagnósticos, o que estimulou estudos sobre as possíveis interações entre a luz laser e biosistemas “*in vivo*” e “*in vitro*”.⁽³⁾

A fotomodulação enzimática envolve a ativação e a inativação das reações enzimáticas através da luz UV e luz visível. As enzimas ou suas reações podem ser afetadas diretamente ou indiretamente. Os efeitos diretos envolvem fotoprodução de substrato, fotodissociação de um inibidor, irradiação de um cromóforo e irradiação de uma enzima-substrato. Já os efeitos indiretos envolvem a expressão de um gene e outros fotorreceptores que não fazem parte da enzima, síntese de proteínas, membranas e fotossíntese.⁽⁴⁶⁾

Contudo, o mecanismo molecular no qual o laser de baixa potência altera mudanças na função e estruturas de células permanece incerto.⁽²²⁾

É importante salientar que a dose é um dos aspectos mais importantes da aplicação laser e no qual se encontra maior divergência. A dose ideal a ser utilizada é baseada em pesquisas na literatura, que descrevem práticas laboratoriais de sucesso, sendo estimada de acordo com o tecido a ser irradiado e ajustada conforme a energia absorvida para cada tecido, tempo de irradiação e tamanho da área a ser irradiada.^(13,27)

Kujawa *et al.*⁽³⁴⁾, investigaram as transformações sofridas na membrana de eritrócitos humanos pela irradiação laser (810 nm). A atividade da acetilcolinesterase (Achase) foi utilizada como marcador das possíveis mudanças estruturais e funcionais da membrana. Os autores utilizaram dois parâmetros para analisar os resultados: a $V_{m\acute{a}x}$ e o K_m . A irradiação laser da suspensão de células sanguíneas resultou em um complexo bifásico dose-dependente

nas mudanças dos parâmetros (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da reação da Achase: a baixas doses de irradiação a $V_{m\acute{a}x}$ diminuía e aumentava a altas doses. A K_m similarmemente atingia o mínimo para 6 J de dose de energia e aumentava seu valor sob altas doses. A inibição da Achase a baixas doses de irradiação foi acompanhada por um aumento na afinidade pelo substrato (K_m baixo), enquanto que o aumento da $V_{m\acute{a}x}$ a altas doses de irradiação é acompanhado por diminuição na afinidade pelo substrato (K_m alto). Tais mudanças na atividade enzimática refletem em complexos de membrana ou transformações enzimáticas. A dependência bifásica da atividade da Achase pelas doses de irradiação podem ter refletido em um efeito direto da luz sobre a enzima ou um efeito indireto devido a mudanças nos constituintes da membrana enzimática.

Amat *et al.*⁽⁴⁷⁾ analisaram o comportamento bioquímico da molécula de ATP após irradiação com laser diodo 635nm e 830nm utilizando a reação lucifénire-luciferase. Os autores relataram que o efeito da Irradiação laser sobre a ATP na reação causou diferenças significativas nos parâmetros k (constante da reação) e no (V_0) pico luminescente. O pico luminescente e o valor de k foram maiores para os grupos irradiados. Como k foi maior para o grupo irradiado, a reação ocorreu mais rápida que o normal. Os autores sugerem que a molécula de ATP é eletronicamente excitada pela luz visível e vibracionalmente excitada pela luz na região vermelho – próximo, e portanto uma molécula de ATP excitada necessita menor energia de ativação para fazer sua quebra. Outra observação importante foi que os aumentos de V_0 e de k não foram proporcionais a exposição a irradiação, levantando assim a hipótese de que alguma forma de saturação ocorreu nas moléculas de ATP.

Rossetti e Lombard⁽⁴⁸⁾, avaliaram a atividade da enzima glutamato decarboxilase (GAD) “*in vitro*”. Esta enzima cataliza a síntese do GABA (ácido γ -aminobutírico), sendo portanto muito importante para as pesquisas neuronais. Baixas doses de irradiação com o laser He-Ne foram aplicadas afim de investigar o metabolismo cerebral de ratos, avaliando a atividade da GAD. Os efeitos observados neste estudo, após irradiação com He-Ne foi um aumento significativo na atividade da GAD. Os autores relataram que esse aumento é devido a interação da luz laser coerente com as bandas de baixa energia encontradas no sítio catalítico da enzima, porém também afirmam que os mecanismos desta interação ainda não foram estabelecidos.

Amat *et al.*⁽⁴⁹⁾ esquematizou o caminho celular que pode ser ativado quando a luz

interagir com ATP, com Na^+/K^+ ATPase, mitocôndrias, enzimas e membrana fosfolipídica responsável pela regulação de sinal de Ca^{2+} . Os efeitos de estimulação no campo eletromagnético induzido pela luz vai depender da concentração celular de substratos, produtos e enzimas. Essas concentrações são determinadas através dos caminhos bioquímicos que estiverem ativos na célula quando a irradiação ocorrer. Porém sempre dependendo do estado metabólico da célula.

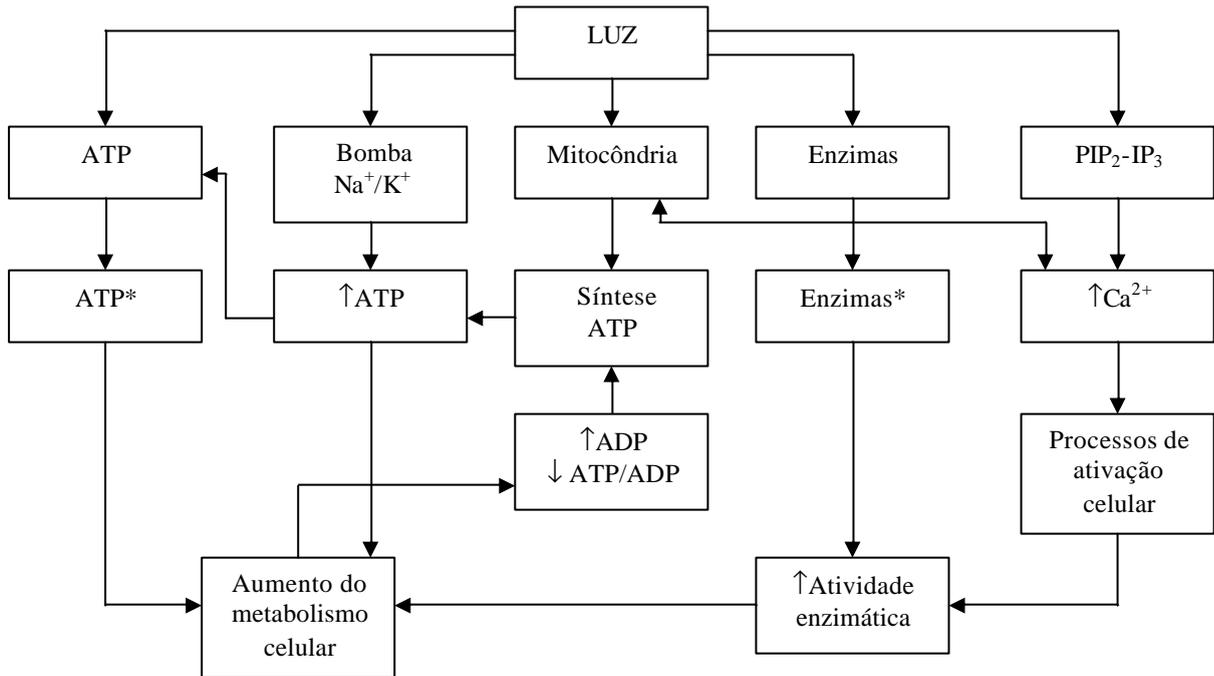


Figura 2: Caminhos celulares que podem ser ativados quando a luz laser interagir com ATP, Na^+/K^+ ATPase, mitocôndrias, enzimas e fosfolídeos de membrana que regulam sinais de Ca^{2+} (legenda: ATP*, ATP estimulado pela luz; enzimas estimuladas pela luz*). Tradução: Juliana Wagner Potrich. Fonte: AMAT *et al.*⁽⁴⁹⁾.

Um aumento na concentração de Ca^{2+} dará início a diversos processos metabólicos. A atividade enzimática aumentará devido aos efeitos do Ca^{2+} e pela ativação das moléculas de enzimas pela luz. O metabolismo será iniciado pela ação direta da luz na mitocôndria, dos efeitos do Ca^{2+} na mitocôndria e da excitação do ATP no citoplasma pela irradiação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Para a realização dos experimentos, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Amilase CNPG Liquiform (Labtest Diagnostica S.A.) – sistema para determinação de a-amilase em amostras biológicas (figura 3);
- Soro controle (Qualitrol 1H – Labtest Diagnostica S.A.) – preparação liofilizada em matriz protéica humana, contendo vários componentes dentre eles a a-amilase (figura 4).

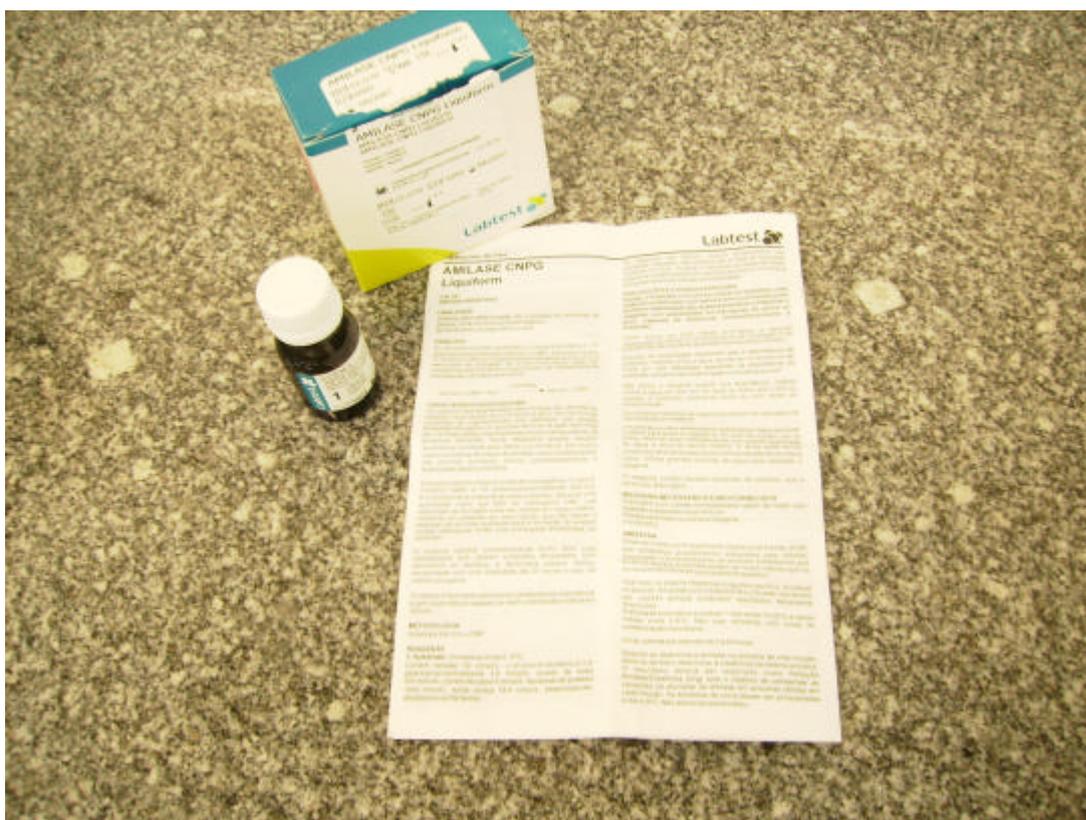


Figura 3: Amilase CNPG Liquiform (Labtest Diagnostica S.A.) – sistema para determinação de a-amilase em amostras biológicas.

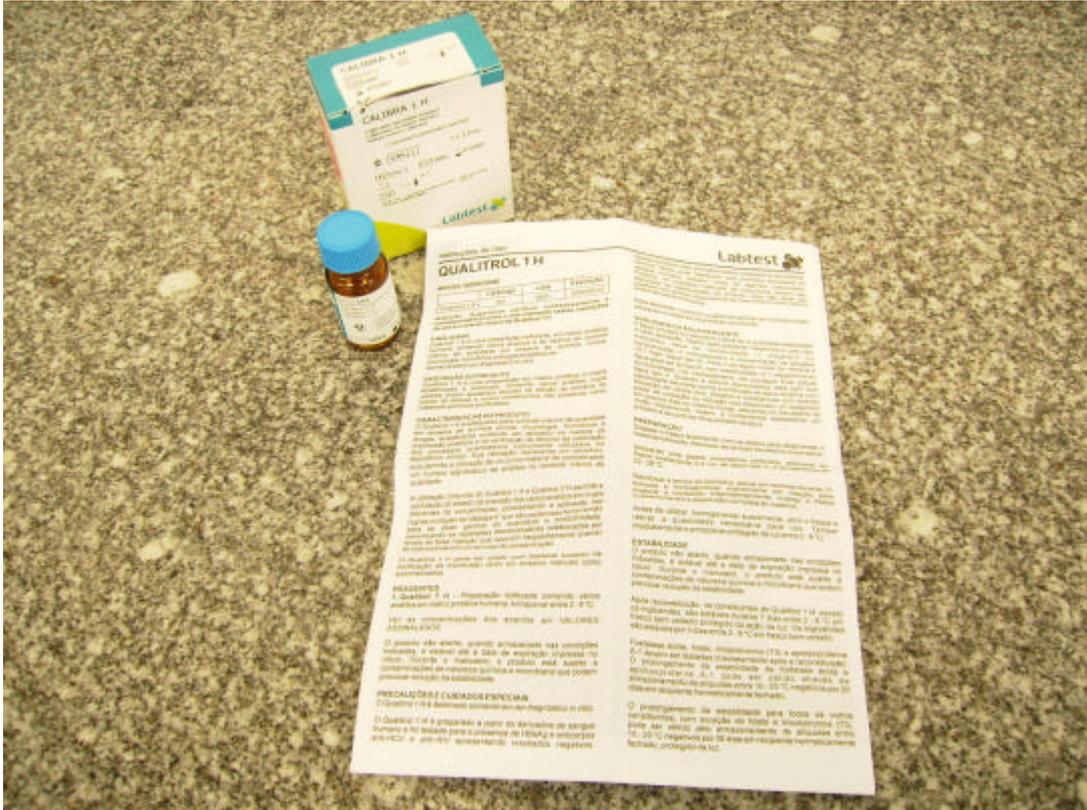


Figura 4: Soro controle (Qualitrol 1H – Labtest Diagnostica S.A.) – preparação liofilizada em matriz protéica humana, contendo vários componentes dentre eles a α -amilase.

4.2 Aparelho laser

Foi utilizado o laser diodo GaAlAs (Endophoton LLT 0107), densidade de energia 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 J/cm², densidade de potência 50 W, comprimento de onda (λ) 904 nm, modo pulsado (2 Hz) e tempo de irradiação da amostra automaticamente ajustado pelo aparelho conforme a DE utilizada (figura 5).

· Especificações do equipamento:

KDL Biosistemas Equipamentos Eletrônicos LTDA

Nome Técnico: Laser para terapia

Nome Comercial: Endophoton

Modelo: LLT0107

Potência Nominal: 50 W

Energia: Ajustável via display em mJ ou J/cm²

- **Caneta emissora PW 904-50**

Emissão laser Diodo Pulsado 75 W InAsGa (invisível)

Potência de saída (média): 50 mW

Comprimento de onda: 904 nm

Largura do pulso: 100 ns

Potência do pico: 50 mW

Tipo de feixe: Divergente

Área de emissão 0,01 cm²

Material de aplicação: contato

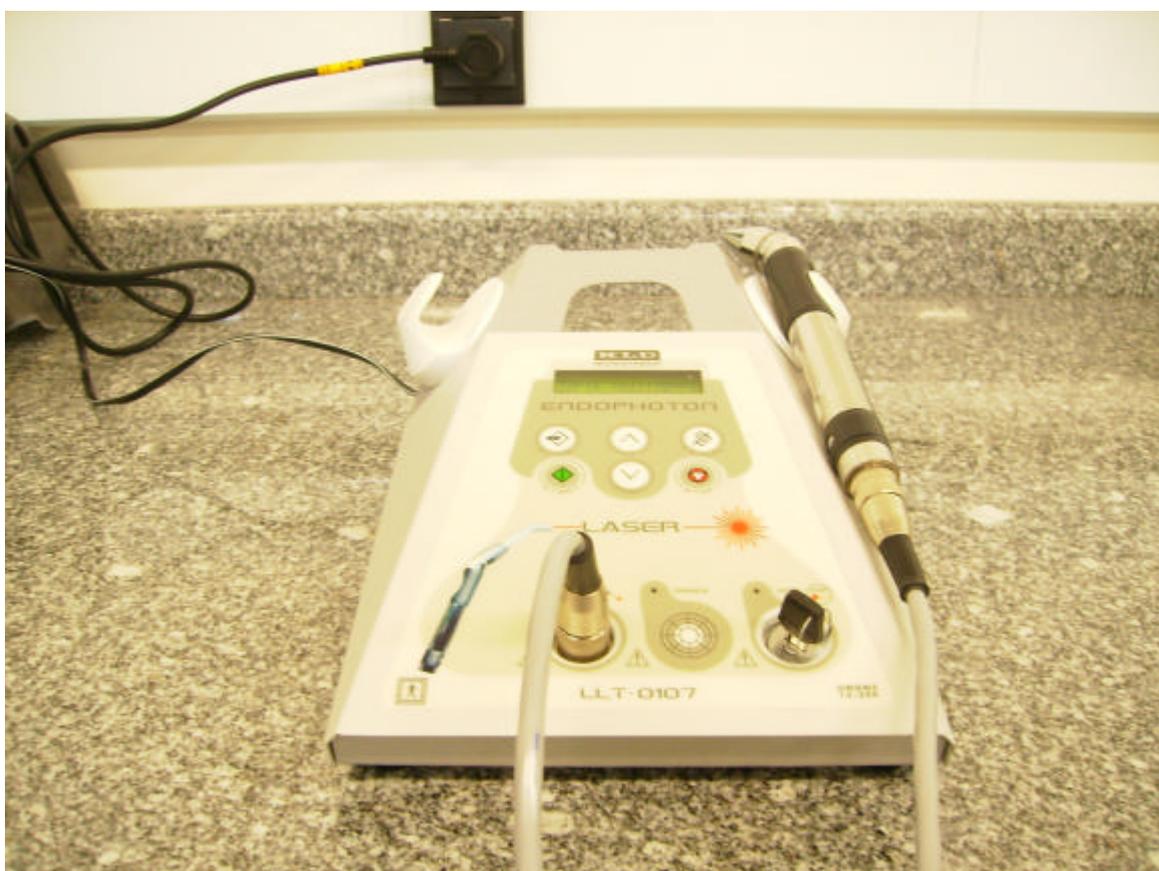


Figura 5: Laser diodo GaAlAs (Endophoton LLT 0107).

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica nas dependências da Unochapecó (Chapecó-SC), sob uma bancada com superfície clara e lisa, a temperatura ambiente.

4.3 Grupos experimentais

A análise laboratorial da α -amilase foi realizada em 2 grupos amostrais:

1. Enzima + substrato – utilizados 1,0 mL de substrato e 0,02 mL de enzima chegando a um volume final de 1,02 mL (1020 μ L);

2. Enzima + substrato + laser – 0,02 mL de enzima, 1,0 mL de substrato em seguida foi irradiado com laser GaAlAs de acordo com parâmetros estipulados.

Então:

Concentração do substrato: 3 mmol / L

Volume do substrato (amido): 1,0 mL

Volume da enzima: 0,02 mL (20 μ L)

Volume total da reação: 1,02 mL (1020 μ L)

Para o grupo 2 foram realizadas 4 irradiações com laser GaAlAs de dosagens crescentes (de 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 J/cm²) sendo que para cada irradiação foram realizadas 6 (seis) repetições.

A figura 6 mostra a técnica de aplicação do laser GaAlAs sobre as amostras enzima + substrato. Para evitar espalhamento e perda da luz, foi utilizado uma cubeta de polietileno.

O tempo de cada irradiação variou conforme a dose aplicada. Foram 1 s, 4 s, 20 s e 12 s, correspondentes com as doses de irradiação de 0.01, 0.1, 0.5 e 1 J/cm².



Figura 6: Técnica de aplicação do laser GaAlAs sobre as amostras.

4.4 Espectrofotômetro

Após os procedimentos acima descritos, foram feitas as leituras (todas imediatamente após irradiação) em Espectrofotômetro BTS 310 Bio System equipado com cubeta termostática capaz de medir com exatidão a absorbância em 405 nm (figura 7).

- Banda de passagem: < 8 nm
- Luz espúria: <0,1 %
- Temperatura da cubeta: 37° C +/- 0,2°C
- Espessura da cubeta: 10 mm
- Comprimento de onda (λ): 405 nm
- Tipo de reação: Crescente
- Tempo de incubação: 30 s
- Tempo de reação: 60 s
- Fator de multiplicação: 3953
- pH da solução: 6.0
- Exatidão: 93,5 a 95,9%

- Erro sistemático médio: 5,3%
- Especificidade: 99,10%
- Repetibilidade (imprecisão intraensaio): 1,34%
- Reprodutibilidade (imprecisão total): 1,68%
- Sensibilidade: 3,9 U por L



Figura 7: Espectrofotômetro BTS 310 Bio System.

4.5 Análises estatísticas

A fim de comparar os resultados obtidos e estabelecer confiabilidade do método proposto, utilizou-se o teste T de Student e percentual enzimático de acordo com as fórmulas:

$$t_{\text{Calculado}} = \frac{(\bar{x}_A - \bar{x}_C)}{\sqrt{s_0^2 \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_C} \right)}}$$

onde:

\bar{x}_A é a média do tratamento que se deseja comparar;

\bar{x}_C é a média do tratamento controle;

n_A é o número de observações do tratamento que se deseja comparar;

n_C é o número de observações do tratamento controle;

s_0^2 é a variância comum às duas populações, obtida pela média ponderada das variâncias amostrais:

$$s_0^2 = \frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_C - 1)s_C^2}{n_A + n_C - 2} \text{ em que } s_A^2 \text{ é a variância do tratamento que se deseja comparar e}$$

s_C^2 é a variância do tratamento controle.

Os valores de t calculados para a comparação de cada tratamento com o controle são comparados ao valor de t tabelado em função do nível de significância (5%) e dos graus de liberdade (gl): $gl = n_A + n_C - 2$

Sempre que $|t_{\text{Calculado}}| > t_{\text{tabelado}}$, rejeita-se a hipótese de que as médias dos tratamentos não diferem.

Os gráficos foram feitos no Sigma Plot.

5 RESULTADOS

Dois parâmetros foram utilizados para analisar os resultados. O teste T e percentual enzimático. A tabela 1 mostra os valores médios da atividade enzimática da a-amilase sem a irradiação e após a irradiação e mostra as diferenças em percentual (%) e com o teste t.

Tabela 1: Valores médios da atividade da enzima a-amilase submetida a irradiação com laser de GaAlAs, comprimento de onda 904 nm, potência 50mW, no modo pulsado (2Hz).

Treatamento	Média (u/L)	Diferença ¹ (%)	t _{Calculado} ²
Controle	64,50	-	-
		E + S + L	
0,01	64,56	0,10	0,02
0,1	73,16	13,44 ^a	2,54*
0,5	72,60	12,57 ^a	2,30*
1	60,56	-6,10 ^a	-0,86

¹ Valores seguidos pela letra “^a” são diferenças superiores a 5,3% em relação ao tratamento controle.

² Valores para $t_{calculado}$ seguidos por “*” simbolizam que as médias dos tratamentos diferem do controle a 5% de significância pelo teste t para comparação de duas médias

A fotomodulação da atividade da a-amilase pela irradiação com laser GaAlAs nas condições anteriormente descritas, foi analisada após irradiação com diferentes doses (0,01, 0,1, 0,5 e 1 J/cm²). Como mostrado na tabela 2 e figura 8, as doses de irradiação no intervalo de 0,01 - 1 J/cm² causaram diferenças na atividade enzimática: 0,01 J/cm² (0,10%), 0,1 J/cm² (13,44%), 0,5 J/cm² (12,57%) e 1 J/cm² (- 6,10%).

Sempre que $|t_{Calculado}| > t_{tabelado}$, rejeita-se a hipótese de que as médias dos tratamentos não diferem. Ou seja, quando se analisou os resultados em porcentagem teve um aumento em todas as doses aplicadas, discordando quando aplicou-se o teste T, obtendo resultados significantes somente para as doses 0,1J/cm² e 0,5 J/cm²

De acordo com a tabela 1 pode-se considerar como aumentos significativos somente as doses 0,1J/cm² e 0,5 J/cm², já que o teste t detecta qualquer variabilidade entre os pontos (as repetições).

Tabela 2: Relação da concentração da atividade da a-amilase irradiada com laser GaAlAs.

E+S+L	Média da atividade (U/L) da a-amilase	Aumento da atividade enzimática da a-amilase em relação ao controle (%)
Controle	64,50	100,00
0,01 J/cm ²	64,56	0,10
0,1 J/cm ²	73,16	13,44
0,5 J/cm ²	72,60	12,57
1 J/cm ²	65,91	-6,10

De acordo com as recomendações do fabricante do Kit da a-amilase utilizado neste experimento, o erro sistemático proporcional médio obtido é de 5,3%. Considerando o erro sistemático proporcional médio de 5,3%, obteve-se aumentos significativos em relação a média do controle (64,50 U/L) somente as dosagens 0,1J/cm² cujo aumento foi de 13,44% corresponde a média 73,16 U/L, e a dose de 0,5 J/cm² que teve um aumento de 12,57% correspondente a média 72,60 U/L. Para 1 J/cm² observou-se uma inibição da atividade da a-amilase em relação ao controle (- 6,1%).

A figura 8, demonstra a atividade enzimática média para cada dose de irradiação seguida do percentual em relação à atividade do tratamento controle.

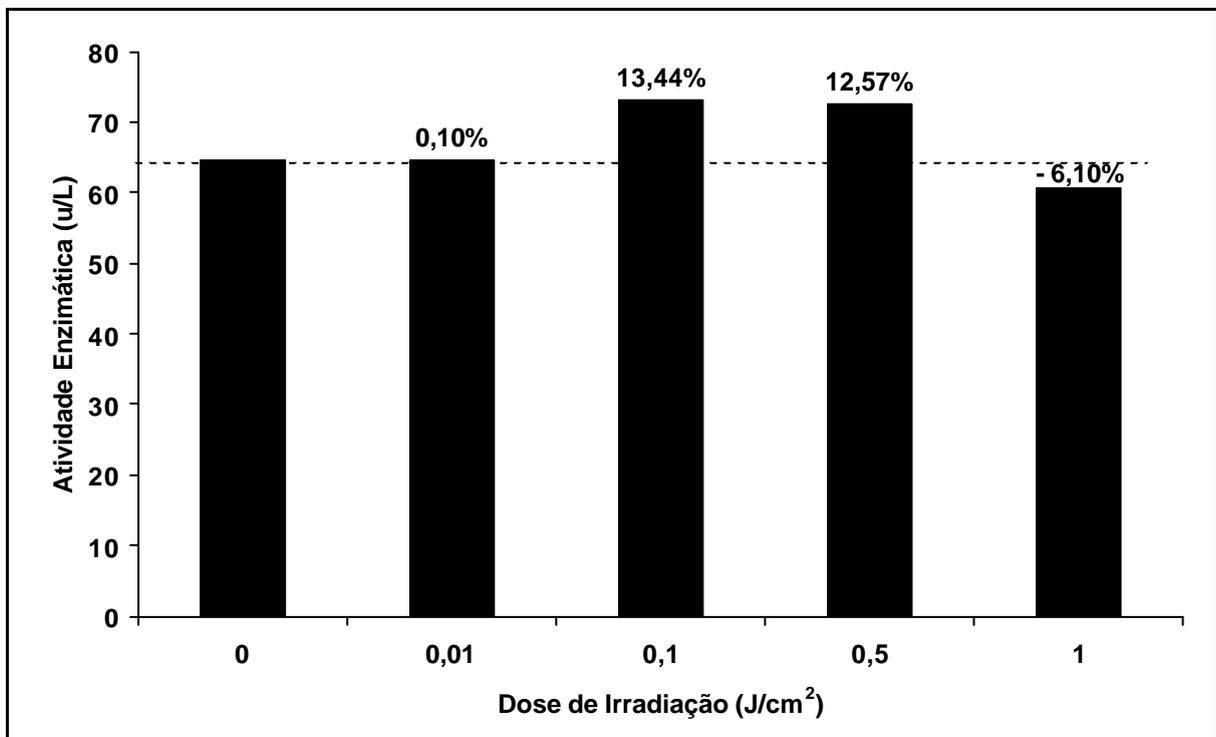


Figura 8: “In vitro” atividade enzimática média da a-amilase para cada dose de irradiação seguida do percentual em relação à atividade do tratamento controle.

Na figura 9, o gráfico representa a atividade enzimática (U/L) pela dose de irradiação (J/cm^2).

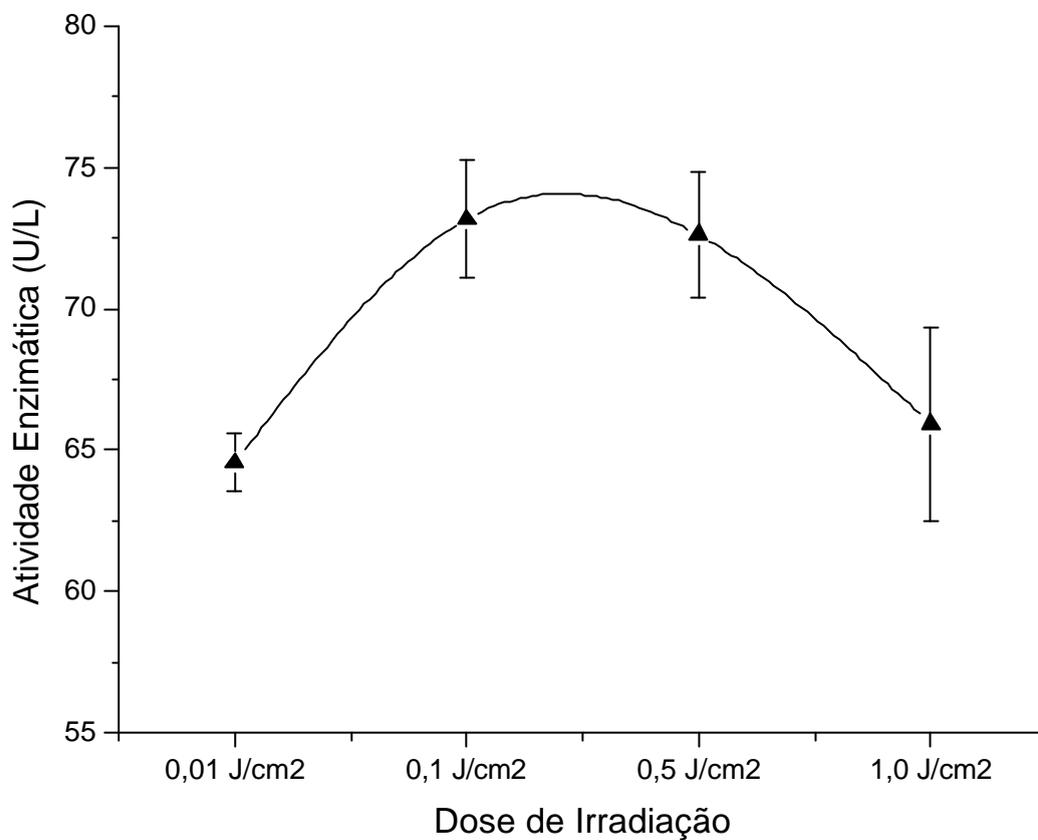


Figura 9: “*In vitro*” atividade enzimática média da α -amilase e respectivo intervalo com 95% de confiança pelo teste t, para cada dose de irradiação avaliada.

6 DISCUSSÃO

A utilização do Laser de Baixa Potência como forma terapêutica tem sido investigada há algumas décadas. Estudos mostram que essa forma de irradiação pode estimular processos biológicos, sendo especialmente utilizado na fisioterapia, medicina e odontologia. A literatura consultada nesse trabalho, referência poucos estudos sobre os efeitos do LBP na atividade enzimática, porém alguns trabalhos foram realizados e então utilizados como referência para este.

O princípio da α -amilase é hidrolisar o substrato α (2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2- α -CNP), liberando 2-cloro-4-nitrofenol (CNP) e 1,4-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2). A velocidade de formação de 2-cloro-4-nitrofenol pode ser medida fotometricamente e proporciona uma medida direta da atividade da α -amilase na amostra.

No presente estudo, foi irradiado a α -amilase com laser GaAlAs (904 nm), com o objetivo de verificar se haveria ou não uma variação em sua atividade. De acordo com os dados obtidos, verificou-se um aumento estatisticamente significativo da atividade enzimática com a dose de 0,1 J/cm² (13,44%), e para 0,5 J/cm² o aumento foi de 12,57%. Efeito semelhante foi encontrado por Lombard⁽³⁾, onde avaliaram o efeito *in vitro* da irradiação com laser He-Ne sobre a atividade da Isocitrato desidrogenase. Neste trabalho, os pesquisadores observaram que após a irradiação com as doses 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 J/cm², a atividade desta enzima apresentou um aumento estatisticamente significante. Na dose de 0,3 J/cm², ocorreu um aumento percentual de 10,02%, na atividade desta enzima em relação ao controle. Os autores desse artigo sugerem a existência de uma “dose window” na qual a atividade da enzima ocorre. Este trabalho assemelha-se ao presente estudo pela característica de ativação enzimática. Começando com um aumento na atividade até uma determinada dose de energia que começa a cair.

Para sofrer a reação, as moléculas precisam superar a barreira energética que existe entre substrato e produto (que representa a energia necessária para o alinhamento dos grupos químicos reagentes, formação de cargas transientes instáveis, rearranjo de ligações e outras transformações necessárias para que a reação ocorra em uma direção ou outra), precisam ser

elevadas a um nível superior de energia. No topo da colina de energia está um ponto no qual a queda para o estado de S ou P é igualmente provável (é sempre um caminho morro abaixo). Isto é chamado de estado de transição. Este estado não é uma espécie química com qualquer estabilidade significativa e não deve ser confundido com um intermediário da reação. Ele é apenas um momento molecular no qual os eventos como o rompimento de ligações, formação de ligações e desenvolvimento de cargas ocorreram até um ponto tal que o colapso, em direção quer ao substrato quer ao produto, é igualmente provável.⁽²⁾ Este momento molecular, é, portanto, um momento virtual, onde ocorre a interação enzima-substrato, no qual o laser consegue detectar mas por ser muito rápido a literatura especializada sugere hipóteses sobre o mecanismo.

Desta forma os efeitos de ativação da α -amilase pela irradiação laser GaAIs poderiam ser atribuídos a alguns mecanismos como modificações conformacionais no sítio catalítico e variações na energia de ativação.

O fato de se ter utilizado o laser pulsado a 2 Hz, pode também ter contribuído para esse aumento da atividade da α -amilase “*in vitro*”. Há alguns estudos que relatam que o laser no pulsado é um fator importante na LLLT. Por exemplo, Ueda e Shimizu⁽⁵⁰⁾, encontraram melhores efeitos utilizando 1 ou 2 Hz que 8 Hz com laser 830 nm em células da medula de ratos, porém o mecanismo para este efeito ainda não está claro.

Chen *et al.*⁽⁵¹⁾, estudaram sementes de *Isatis indigotica* Fort embrionárias, expondo-as a irradiação com He-Ne (5.23 mW/mm²/5min) e microondas (1.26 5.23 mW/mm²/8 seg), para determinar os efeitos do He-Ne e do microondas sobre a atividade das enzimas. Estatisticamente, os pesquisadores relataram um aumento significativo na atividade da α -amilase (73.3%); amilase total (40.8%); GOT (23%); GTP (40.6%) e proteinase (13.1%). Concluindo assim que o laser He-Ne acelera a divisão celular e o crescimento das sementes de *Isatis indigotica*. As explicações para o efeito do laser He-Ne são as seguintes: (i) a irradiação com laser He-Ne causa um aumento da atividade enzimática e acelera as reações mediadas por enzimas através de um campo eletromagnético e calor (energia) que afetam as moléculas na célula e aumentam a atividade biológica, finalmente induzindo a uma elevação da entropia e energia interna das sementes durante a germinação. O mecanismo de ação responsável pelos efeitos da irradiação laser pode ser através dos efeitos da luz e de efeitos eletromagnéticos.

Em 1993, Ostuni *et al.*⁽⁵²⁾ fizeram um estudo com a glutamato desidrogenase, onde

irradiaram a enzima com laser He-Ne (632nm). Houve um aumento da atividade da glutamato desidrogenase, porém os mecanismos pelo qual essa ativação ocorreu ainda são controversos. Os pesquisadores relatam que o principal problema é na identificação do alvo direto durante o processo de irradiação. Eles sugerem então que os achados experimentais indicam que a estrutura e função da enzima mitocondrial glutamato desidrogenase foram modificadas pela luz laser.

Bolognani *et al.*⁽⁵³⁾, relataram que a miosina ATPase previamente inativada pelo gás CO₂ pode ser parcialmente reativada após irradiação com lasers He-Ne (632.8 nm) e diodo (904 nm). Também, a enzima irradiada poderia atuar de modo inverso (quando condições apropriadas fossem encontradas), sintetizando ATP pelo ADP e Pi. Esta síntese de ATP foi aumentada pela irradiação laser. Os efeitos encontrados foram não-térmicos, já que a temperatura não foi elevada e também não teve absorção nos comprimentos de ondas estudados.

A fim de confrontar com os resultados do presente estudo, Carvalho⁽¹⁸⁾, relatou que a terapia com laser de baixa potência foi capaz de reduzir a atividade da enzima mieloperoxidase e a concentração de PGS2 e TXA2 no lavado bronco-alveolar de ratos após a instilação intratraqueal de LPS. Porém, ressaltando que o LBP apresentou um efeito antiinflamatório menos pronunciado sobre a concentração de PGS2. Podendo sugerir que o LBP não age de forma idêntica sobre os mediadores inflamatórios ainda que estes sejam oriundos da mesma via metabólica. Esse resultado refere-se a uma inibição enzimática, diferentemente dos resultados encontrados nesse trabalho.

O gráfico (figura 9), que apresenta a atividade enzimática (U/L) pela dose de irradiação (J/cm²), apresentou uma curva com mesmo comportamento do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática e o efeito do pH sobre a atividade enzimática. Ao comprovar experimentalmente a influência do pH na velocidade das reações enzimáticas se obtém curvas que indicam que as enzimas apresentam um pH ótimo de atividade. Como a conformação das proteínas depende, em partes, de suas cargas elétricas, haverá um pH no qual a conformação será a mais adequada para a atividade catalítica, o chamado pH ótimo. Ligeiras mudanças de pH podem provocar a desnaturação da proteína. Com a temperatura ocorre um comportamento semelhante. Ela influencia na atividade e o ponto ótimo representa o máximo de atividade. As temperaturas baixas, as enzimas encontram-se muito rígidas e

quando se supera um valor considerável (maior que 50°C) a atividade cai bruscamente porque, como proteína, a enzima se desnatura. Em geral, os aumentos de temperatura aceleram as reações químicas: a cada 10°C de aumento, a velocidade de reação se duplica. As reações catalisadas por enzimas seguem esta lei geral. Entretanto, sendo proteínas, a partir de certa temperatura, começam a desnaturar-se pelo calor.

Este comparativo entre temperatura e pH com a curva da atividade enzimática em relação a dose de irradiação apresentada neste trabalho, sugere que o possível mecanismo pela qual a enzima apresentou atividade máxima e depois começou a decrescer esteja relacionado com as estruturas protéicas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas, pois estas são essenciais para o exercício da atividade catalítica, o que significaria que qualquer alteração nessas estruturas poderia aumentar ou diminuir sua atividade.

7 CONCLUSÃO

Segundo a metodologia utilizada nesse trabalho, a irradiação com o laser de baixa potência GaAlAs com comprimento de onda 904 nm indicou que:

- A irradiação com o laser de baixa potência Arseneto de Gálio e Alumínio (904 nm) teve influencia sobre a atividade da α -amilase.

- Para as doses de $0,1 \text{ J/cm}^2$, $0,5 \text{ J/cm}^2$ o tratamento ESL apresentaram aumentos estatisticamente significativos da atividade enzimática quando comparadas ao controle tanto no teste T como percentual enzimático.

REFERÊNCIAS

- (1) ARANTES, Guilherme. Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 2, 2008.
- (2) LEHNNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007, 1232 p.
- (3) LOMBARD, A. “In vitro” photomodulation of isocitrate dehydrogenase activity by He-Ne laser irradiation. **Laser Therapy**, v. 11-4, p. 164-169, 1999.
- (4) KENDRIC, C. Smith. The first law of photochemistry and lasers. **Laser Therapy**, v. 11-4, p. 162-163, 1999.
- (5) DELVIN, Thomas M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6. ed. São Paulo: Blucher, 2007.
- (6) CAMPBELL, Mary K.; FARREL, Shawn O. **Bioquímica**. São Paulo: Thomson, 2007.
- (7) MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 3. ed. Porto Alegre: Médica Missau, 2005.
- (8) VOET, Donald; VOET, Judith G. **Fundamentos de bioquímica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- (9) YAMAGUCHI, Masaki *et al.* Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 491-497, 2004.
- (10) MESTER, E. Experimentation on the interaction between infrared laser and wound healing. **Exper Chirurg**, v. 2, p. 94, 1969.
- (11) GENOVESE, João Walter. **Laser de baixa potência intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Santos, 2007.
- (12) HAMBLIN, Michael R.; DEMIDOVA, Tatiana N. Mechanisms of low level light therapy. **Proc. Of SPIE**, v. 6140, 614001, Harvard Medical School, 2006.
- (13) FUKUDA, T. Y.; MALFATTI, C. A. Análise da dose do laser de baixa potência em equipamentos nacionais. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 1, 2008.
- (14) COLLS, J. C. **La terapia láser, hoy**. Barcelona: Centro de Documentación Láser de Meditec, 1984. 164 p.
- (15) BRUGNERA JR., Aldo; PINHEIRO, A. L. **Laser na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.
- (16) ORTIZ, M. C. S. B. *et al.* Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades. Parte

1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001.
- (17) KARU, T. I. Low power laser therapy. In: VO-DINH, T. (ed.). **Biomedical photonics handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003. Chap. 48.
- (18) CARVALHO, F. A. S. **Estudo do efeito do laser de baixa potência em modelos experimentais de inflamação pulmonar em ratos**. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.
- (19) KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. H. A review of low intensity laser therapy: parts 1, 2 and 3. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 166-70, 1991.
- (20) PONTINEN, P. J. **Low level laser therapy as a medical treatment modality**. Tampere: Art Urpo Ltd, 1992.
- (21) VLADIMIROV, Yu A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 1, p. 103-113, 2004.
- (22) KASSAK, P. The response of Na⁺/K⁺ -ATPase of human erythrocytes to green laser light treatment. **Physiological Research**, 55, p. 189-194, 2006.
- (23) KARU, T. *et al.* 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.
- (24) BOURGUIGNON-FILHO, A. M. *et al.* Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 6, p. 37-43, 2005.
- (25) KILANCZYK, E.; PALECZ, D.; BRYCZEWSKA, M. Effect of Red Laser Light on Na⁺, K⁺ - ATPases Activity in Human Erythrocyte Membranes Sensitized with Zn-Phthalocyanine. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, n. 2, p. 71-75, 2002.
- (26) LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Factores affecting Low Level Laser Therapy. **Australian Journal of Physiotherapy**, v. 39, n. 2, p. 95-99, 1993.
- (27) SCHINDL, A. *et al.* Low-intensity laser therapy: a review. **Journal of Investigative Medicine**, v. 48, n. 5, p. 312-236, 2000.
- (28) BORGES, D. S. *et al.* Influência do laser de Arseneto de Gálio sobre a dor no modelo experimental de contorção. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 1, n. 1, p. 1-19, 1996.
- (29) GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermatofuncional**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2002.
- (30) OLSON, J. E.; SCHIMMERLING, W.; TOBIAS, C. A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. **Brain Res.**, 1980, v. 204, p. 436-440.

- (31) KARU, T. Photobiological fundamental of low power laser therapy. **IEEE J. Quant. Elect.**, v. 23 , p. 1703, 1987.
- (32) SMITH, K. C. The photobiological basis of low laser radiatio therapy. **Laser therapy**, v. 3, p. 19-24. 1991.
- (33) MIGLIORATI, C. *et al.* The use of low laser energy laser therapy in oral mucositis. **J Oral applic.**, v. 1, n. 2, p. 97-101, 2001.
- (34) KUJAWA, Jolanta *et al.* Low-intensity near-infrared laser radiation-induced changes of acetylcholinesterase activity of human erythrocytes. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, n. 6, p. 351-355, 2003.
- (35) EL SAYED, S. O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 19, n. 4, p. 433-437, 1996.
- (36) ROCHKIND, S. *et al.* The in-vivo-nerve response to direct low-energy laser irradiation. **Acta Neurochir.**, v. 94, n. 1-2, p. 74-77, 1988.
- (37) AL-WATBAN, F. A.; ZHANG, X. Y. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 15, n. 5, p. 209-215, 1997.
- (38) BECKERMAN, H. *et al.* The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v. 72, p. 483-491, 1992.
- (39) DE BIE, R. A. *et al.* Low-level laser in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v. 79, p. 1415-1420, 1998.
- (40) VIEIRA, W. H. B. *et al.* Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira e laser de baixa intensidade. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 10, n. 2, p. 205-211, 2006.
- (41) ARTYUKHOV, V. G. *et al.* Effect of helium-neon laser on activity and optical properties of catalase. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 129, n. 6, p. 537-540, 2000.
- (42) ASSUNÇÃO, D. *et al.* Tratamento fisioterapêutico da acne por meio do laser. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 16, n. 4, p. 11-16, out./dez. 2003.
- (43) STRASSWIMMER, John; GRANDE, Donald J. Do pulsed lasers produce an effective photodynamic therapy response. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, p. 22-25, 2006.
- (44) KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, 1998.
- (45) MATERA, J. M.; TATARUNAS, A. C.; OLIVEIRA, S. M. Uso do laser arseneto de gálio (904 nm) após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães. **Acta Cirurgia**

- Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 102-106, 2003.
- (46) HUG, Daniel; HUNTER, John K. Photomodulation of enzymes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 10, p. 3-22, 1991.
- (47) 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**, v. 168, p. 59-65, 2004.
- (48) ROSSETTI, V.; LOMBARD, A. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 681, p. 63-67, 1996.
- (49) 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, n. 2, p. 152-160, 2006.
- (50) UEDA, Y.; SHIMIZU, N. Effects of pulse frequency of low Level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, p. 271-277, 2003.
- (51) CHEN, Yi-Ping; LIU, Yong-Jun; WANG, Xun-Ling; REN, Zhao-Yu; YUE, Ming. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *isatis indigotica* fort. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 7, p. 849-855, 2004.
- (52) OSTUNI, A.; PASSARELLA, S.; QUAGLIARIELLO, E. Photomodulation of glutamate dehydrogenase properties by red light. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology**, v. 20, p. 101-111, 1993.
- (53) BOLOGNANI, L. *et al.* ATP synthesis by miosin ATPase: effect of laser and e.m. field. **Laser Technology**, v. 2, n. 3, p. 115-120, 1992.