

ESPECTROS INFRAVERMELHOS DA CREATINA

INFRARED SPECTRA OF CREATINE

Kumiko K. Sakane¹
Maria Angélica G. Cardoso²
Milton Beltrame Junior³
Mituo Uehara¹

RESUMO: São apresentados espectros infravermelhos da creatina, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Os resultados são comparados com espectros observados e calculados, publicados na literatura.

Palavras-chave: creatina; espectros infravermelhos; FTIR; cardiomiopatia; modos normais de vibração.

ABSTRACT: Infrared spectra of creatine in the range of 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} are presented. The results are compared with observed and calculated spectra, published in the literature.

Keywords: creatine; infrared spectra; FTIR; cardiomyopathy; normal vibrations.

¹ Doutorado em Física pelo Instituto Tecnológico de Aeronáutica e docente da UNIVAP. E-mails: kumiko@univap.br; mituo@univap.br.

² Doutorado em Microbiologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas – USP e docente da UNIVAP. E-mail: magcard@univap.br.

³ Doutorado em Química pela Universidade de São Paulo e docente da UNIVAP. E-mail: beltrame@univap.br.

1. INTRODUÇÃO

A molécula de creatina desempenha funções importantes em muitos processos biológicos. Por exemplo, a creatina é conhecida como o mais importante e poderoso suplemento alimentar para aumentar a força e resistência muscular (PODSTAWKA *et al.*, 2007; NISSEN; SHARP, 2003).

Outro exemplo de ação de creatina é encontrado no funcionamento do coração, em que o metabolismo da creatina é essencial para a função cardíaca normal. A reação de creatina quinase (CK) é importante para a rápida ressíntese da molécula de ATP (BITTL; DELAYRE; INGWALL, 1987; BITTL; INGWALL, 1985; ZIMMER *et al.*, 1973).

Nascimben *et al.* (1996) mostraram que, em miocárdio com insuficiência, a quantidade de creatina e a atividade total de creatina quinase são ambas menores que no coração normal. Estudos posteriores mostraram que a relação fosfocreatina/ATP (PCr/ATP) é um indicador importante do risco de morte, em caso de insuficiência congestiva (NEUBAUER *et al.*, 1997; NAKAE *et al.*, 2003).

Gallant *et al.* (2006) sugerem a creatina como marcadora no processo de doença de Alzheimer. O sistema creatina/fosfocreatina exerce um importante papel em manter o equilíbrio de energia no cérebro. O processo de marcação consiste na utilização da banda de absorção em 1308 cm^{-1} no espectro de radiação no infravermelho para detectar a presença de creatina, pois esta banda surge numa região relativamente livre da interferência de outras bandas espectrais de tecidos do cérebro, o

que facilita a sua identificação.

Para se investigar o mecanismo de atuação da creatina, nos diversos processos biológicos em que ela está presente, é necessário conhecer sua estrutura molecular. A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma das técnicas utilizadas em estudos de estrutura molecular. Espectros de absorção no infravermelho fornecem informações sobre os modos de vibração molecular, que por sua vez dependem da estrutura da molécula. A espectroscopia Raman é outra técnica que pode ser usada para se estudar vibrações moleculares. Inovações técnicas recentemente incorporadas a espectrofotômetros Raman e infravermelho vieram renovar o interesse em análises espectroscópicas, particularmente, de biomoléculas (BARTH, 2007; MOGASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008).

O espalhamento Raman é um processo físico diferente da absorção de radiação eletromagnética infravermelha e, conseqüentemente, as equações que dão as intensidades das bandas de espectros Raman e espectros infravermelhos são diferentes, de maneira que um modo vibracional de uma determinada molécula pode dar origem a uma banda Raman forte e a uma banda fraca no infravermelho e vice-versa. Por exemplo, no caso de moléculas com centro de simetria, as bandas espectrais que aparecem no Raman não aparecem no infravermelho e vice-versa (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990). Portanto, as duas técnicas são complementares.

Voltando à molécula de creatina, não há muitos trabalhos publicados sobre análise de espectros dessa molécula.

Mitewa, Enchev e Bakalova (2002) publicaram espectros da creatina, observados experimentalmente e calculados. Podstawka *et al.* (2007) obtiveram espectros Raman e infravermelho da creatina e propuseram uma interpretação dos espectros que não coincide inteiramente com a interpretação de Mitewa, Enchev e Bakalova. Dou *et al.* (1996) obtiveram espectros Raman de urina com adição de creatina, mostrando que há forte correlação entre a intensidade de uma banda espectral da creatina e a concentração dessa substância na urina.

Neste trabalho apresentamos espectros infravermelhos da creatina, no estado sólido. Comparamos nossos resultados com espectros publicados na literatura e propomos interpretações para algumas bandas espectrais. Na seção 2 apresentamos algumas ideias gerais a respeito de modos de vibração e de interpretação de espectros vibracionais de moléculas.

2. MODOS NORMAIS DE VIBRAÇÃO

Uma molécula com N átomos possui $3N$ graus de liberdade, que correspondem a movimentos de translação da molécula como um todo, de rotação em torno de um referencial com a origem no centro de massa da molécula e de vibrações dos átomos que constituem a molécula.

A localização do centro de massa, em relação a um referencial, requer a especificação de três coordenadas. A variação temporal dessas coordenadas descreve o movimento de translação da molécula como um todo. Além da translação, a molécula pode realizar movimentos de

rotação, em relação a um referencial com a origem no centro de massa e três eixos mutuamente perpendiculares. Em relação a esse referencial (referencial do centro de massa) a orientação de uma molécula não linear é definida por três coordenadas angulares. Vemos então que dos $3N$ graus de liberdade da molécula, três correspondem à translação da molécula como um todo e três correspondem a rotações, de modo que restam $(3N - 6)$ graus de liberdade, que correspondem às vibrações dos átomos da molécula. Para moléculas lineares, não se consideram rotações em torno do eixo que contém todos os átomos da molécula, pois os núcleos dos átomos são considerados puntiformes. Nesse caso há apenas dois graus de liberdade que correspondem a rotações, de modo que para moléculas lineares o número de graus de liberdade que correspondem a vibrações é $(3N - 5)$.

As vibrações moleculares envolvem energias que correspondem a energias de fótons infravermelhos. Na espectroscopia molecular, tais fótons podem ser absorvidos pela molécula que está sendo objeto de estudo, excitando modos de vibração da molécula, resultando, dessa interação entre fótons e molécula, espectros de absorção na região do infravermelho. Portanto, a observação de bandas espectrais de absorção na região do infravermelho pode dar informações a respeito de vibrações moleculares. Assim, pode-se investigar através da espectroscopia molecular, a geometria e as forças de interação entre os átomos que constituem a molécula, pois os espectros de absorção no infravermelho dependem desses fatores.

Matematicamente, as vibrações

moleculares são descritas pelos chamados *modos normais de vibração* da molécula (WILSON; DECIUS; CROSS, 1980; COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990). Num modo normal de vibração todos os átomos vibram em sincronia, atingindo ao mesmo tempo o máximo afastamento da sua respectiva posição de equilíbrio e passando, todos ao mesmo tempo, pela sua respectiva posição de equilíbrio. Uma frequência correspondente a um modo normal de vibração é conhecida como *frequência fundamental* ou *normal* de vibração da molécula. Uma molécula não linear constituída por N átomos possui $(3N - 6)$ modos normais de vibração. Os modos normais de vibração de uma molécula possuem propriedades de simetria que dependem da simetria da molécula. Para exemplificar, apresentamos, a seguir, alguns modos de vibração da molécula de água, e

de grupos funcionais que podem fazer parte de diferentes moléculas.

A Fig. 1 mostra os modos normais de vibração da molécula de água (H_2O). Dois modos correspondem a estiramentos das ligações O-H e um modo corresponde à variação do ângulo HOH. Um estiramento é simétrico e outro é assimétrico. Frequências normais de vibrações correspondentes a estiramentos são indicados pela letra grega ν , com um índice (sub-escrito) s , se for simétrico, e a , se for assimétrico. A frequência correspondente a um modo de deformação angular, como a variação do ângulo HOH no caso da água, é indicada pela letra grega δ . No caso da água temos três frequências fundamentais, que são ν_s , ν_a e δ , correspondentes às vibrações de estiramento simétrico, estiramento assimétrico e deformação angular.

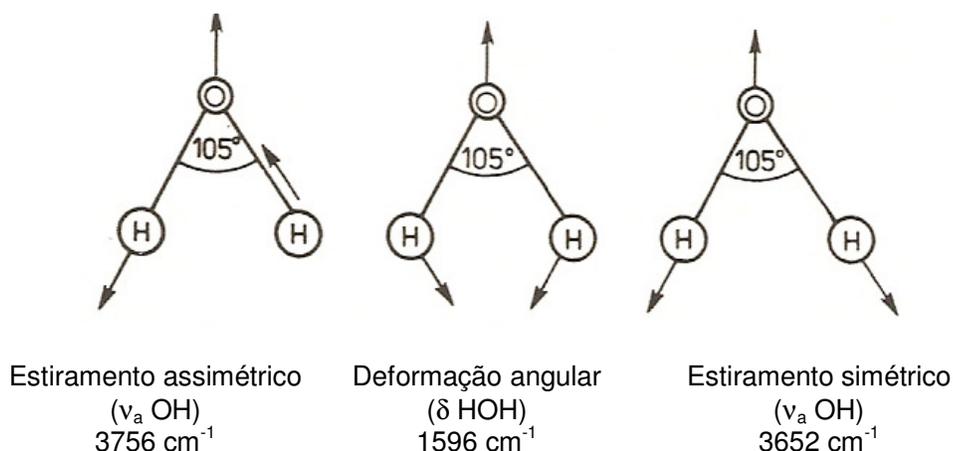


Fig. 1 - Modos normais de vibração da molécula de água.

Em princípio, dadas as massas dos átomos, a geometria da molécula e as constantes de força de ligação entre os átomos, podem ser calculadas as frequências para todos os modos normais

de vibração. No caso da molécula de água tal cálculo é relativamente simples. Entretanto, para moléculas mais complexas, a matemática envolvida pode ser extremamente trabalhosa, de modo que é

necessário fazer uso de observações empíricas. Empiricamente, verifica-se que certos grupos de átomos, que podem fazer parte de diferentes moléculas, consistentemente apresentam bandas espectrais numa região característica do espectro vibracional. As frequências correspondentes a essas bandas caracterizam o grupo. Na interpretação de espectros é importante identificar essas bandas.

Consideremos uma molécula plana do tipo $X_2C = CH_2$ onde X indica um átomo diferente do hidrogênio. O grupo $= CH_2$ apresenta uma vibração em que os átomos de hidrogênio movem-se, em fase, fora do plano do grupo. Nesse modo de vibração, mostrada na Fig. 2, o que varia é essencialmente o ângulo entre o plano CH_2 e a ligação $C = C$, sendo que o restante da molécula não se envolve mecanicamente, permanecendo praticamente parada. Esse modo de vibração é designado em inglês por “wagging” (*to wag*, abanar) e indicada pela letra ρ_w . O grupo NH_2 da creatina apresenta o modo de deformação angular fora do plano ou “wagging”, indicada por ρ_w (NH_2), que dá origem a uma banda de absorção na região de 707 cm^{-1} , como se pode observar na Fig. 5.

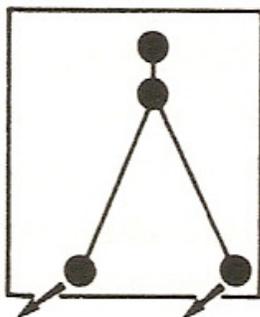


Fig. 2 - Vibração “wagging” do grupo $= CH_2$ (TWARDOWSKI; ANZENBACKER, 1994).

O grupo $= CH_2$ apresenta os modos de vibração semelhantes aos da molécula de água, descritos acima. A Fig. mostra o modo de vibração que envolve a deformação do ângulo HCH designado por “scissoring” e indicado por δ_{scis} em que o índice “scis” vem de “scissors” (tesoura em inglês).



Fig. 3 - Vibração “scissoring” do grupo $= CH_2$ (TWARDOWSKI; ANZENBACKER, 1994).

Há ainda outros tipos de vibração dentre as quais as vibrações correspondentes a “twisting” (*to twist*, torcer) e “rocking” (*to rock*, balançar), indicadas, respectivamente, por ρ_{tw} e δ_r e mostradas na Fig. 4.

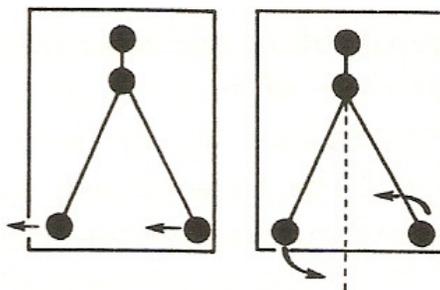


Fig. 4 - Vibrações “rocking” e “twisting” do grupo $= CH_2$ (TWARDOWSKI; ANZENBACKER, 1994).

A Fig. 6 mostra o modelo da molécula

de creatina. Como a massa do átomo de hidrogênio é menor que a massa de cada um dos demais átomos, esses formam o que se costuma chamar de “esqueleto” da molécula. Vibrações correspondentes a deformações do esqueleto são indicadas por $\delta_{\text{esqueleto}}$.

Na interpretação de espectros a intensidade relativa das bandas é de grande importância. Para indicar a intensidade relativa das bandas espectrais é utilizada a notação *vs*, *s*, *m*, *w*, que correspondem, respectivamente, a bandas de intensidade *muito forte* (“*very strong*”), *forte* (“*strong*”), *média* (“*medium*”) e *fraca* (“*weak*”).

Além da intensidade relativa, a forma da banda também é relevante e, na descrição de espectros, a notação “*sh*”, derivada de *shoulder* (ombro em inglês), ao lado do valor de número de onda de uma determinada banda, indica que essa banda

aparece como uma pequena saliência no contorno de uma outra banda mais intensa. Por exemplo, na Tabela 1, que apresenta os dados de Mitewa *et al.* (2002), a banda em 3380 cm^{-1} é indicada como *sh*, ao lado de uma banda forte (*s*) em 3275 cm^{-1} .

3. OBTENÇÃO DO ESPECTRO

A creatina foi utilizada após recristalização a partir de água destilada. Os espectros infravermelhos no intervalo de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ foram obtidos no estado sólido a temperatura ambiente. A resolução foi de 4 cm^{-1} . Os espectros conferem com os publicados na literatura (Integrated Spectral Database System of Organic Compounds, 2009). Os espectrofotômetros utilizados foram Spectrum GX FT-IR e Spotlight 400 FT-IR da Perkin-Elmer do IP&D, UNIVAP. O espectro é mostrado na Fig. 5.

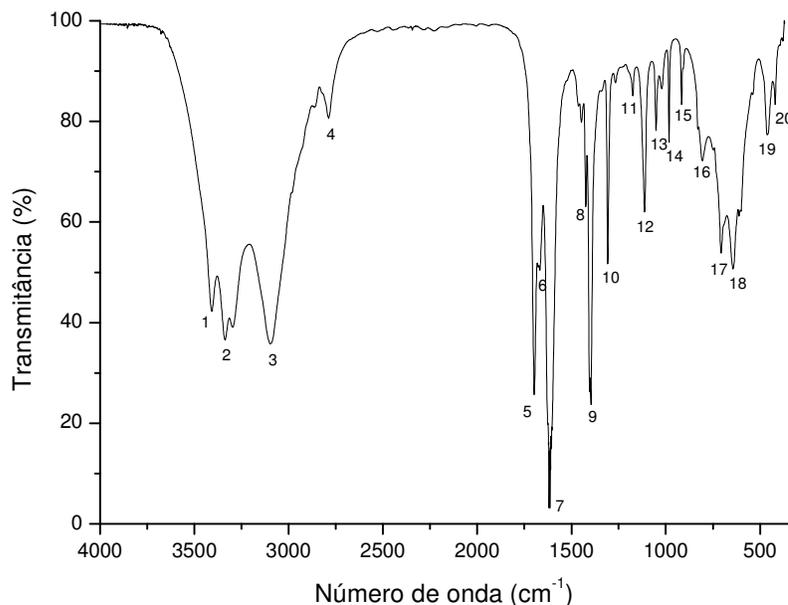


Fig. 5 - Espectro Infravermelho de creatina no estado sólido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

e a numeração dos átomos da creatina.

A Fig. 6 mostra a fórmula estrutural

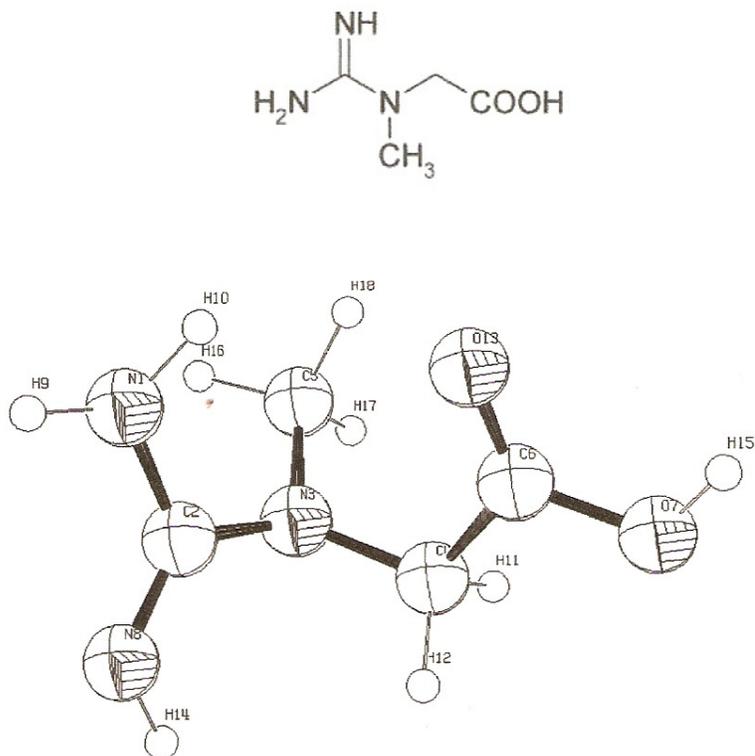


Fig. 6 - Fórmula estrutural e numeração de creatina (MITEWA; ENCHEV; BAKALOVA, 2002).

A atribuição vibracional para a creatina baseou-se nas comparações com os compostos semelhantes apresentados na literatura (RAMOS *et al.*, 2006; COLTHUP *et al.*, 1990) e da própria creatina existente na literatura (MITEWA; ENCHEV; BAKALOVA, 2002; PODSTAWKA *et al.*, 2007).

Mitewa, Enchev e Bakalova (2002)

realizaram os cálculos do esqueleto de creatina obtendo resultados teóricos nos intervalos de $3500\text{-}1300\text{cm}^{-1}$. O método *ab initio* foi realizado por um pacote de programa GAMESS, *General Atomic and Molecular Electronic Structure System*. Os resultados teóricos foram comparados aos experimentais. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos por eles.

Tabela 1 - Números de onda (cm^{-1}) e descrição aproximada obtidos por Mitewa *et al.* (2002)

Calculados (cm^{-1})	Experimentais (cm^{-1})	Descrição Aproximada
3453, 3338	3380sh, 3275s	v (NH) no grupo NH_2
3435	3349s	v (OH)
3285	3073s	v (N8-H14)
1742	1690s	v (C=O) no grupo $-\text{COOH}$
1673	1616s	v (C2=N8)
1618	1600s	δ_{scis} (NH_2)
1362	1393s	u (C2-N1) + δ (C2N1H)

Podstawka *et al.* (2007) obtiveram os resultados experimentais e atribuições. Os espectros Infravermelho e Raman de creatina e realizaram as atribuições aproximadas baseadas nos compostos semelhantes nos intervalos de 800-1200 cm^{-1} e os espectros Raman mais 1700-400 cm^{-1} . A Tabela 2 mostra seus resultados experimentais e atribuições. Os espectros no Infravermelho e Raman obtidos por eles mostram que os de Infravermelho são mais ricos, em bandas, na faixa de 800-1200 cm^{-1} e os espectros Raman mais ricos na faixa de 1200-400 cm^{-1} .

Tabela 2 - Números de onda (cm^{-1}) e descrição aproximada obtidos por Podstawka *et al.* (2007)

Observados (cm^{-1})	Descrição Aproximada
1699	v (C=O) no grupo $-\text{COOH}$
1666	v (C2=N8)
1615	δ_{scis} (NH_2)
1423	δ_{scis} (CH_2)
1398	ν_s (COOH), v(C2-N1) + δ (C2N1H)
1306	δ (CH_3), δ_{scis} (NH_2) + ρ_{tw} (NH_2)
1173	u_a (C2-N3-C5) + δ (N3C3H)
1111	ν_a (N3- CH_3)
1048	u_a (C2=N8) + v (C2- NH_2)
982	ρ_w (CH_2)
915	v(C-COOH)/ v(C-COO $^-$)
811	
707	ρ_w (NH_2)
643	$\delta_{\text{esqueleto}}$
465	
420	

Ramos *et al.* (2007) fizeram os cálculos de números de onda no intervalo de 3800-400 cm^{-1} pelo DFT; B3LYP/6-31G (*Density functional theory with B3LYP/6-31G*)

basis sets) para aminoácido guanidoacético. Esta molécula possui uma estrutura semelhante à creatina, com a substituição do grupo $-CH_3$ por átomo de hidrogênio.

Os principais números de onda observados por nós, suas intensidades e atribuições aproximadas de creatina estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Números de onda (cm^{-1}) e descrição aproximada obtidos por nós

Numeração de bandas	Nossos Resultados Observados (cm^{-1})	Nossa Descrição Aproximada
1	3407s	v_a (NH_2)
2	3337s, 3260s	v_s (NH_2)
3	3098s	v (N8-H14)
4	2788w	v (CH) nos grupos $-CH_3$ e/ou $-CH_2$
5	1698vs	v (C=O) no grupo $-COOH$
6	1666s	v (C2=N8)
7	1618vs	δ_{scis} (NH_2)
8	1424m	δ_{scis} (CH_2)
9	1404vs, 1397vs	v (C2-N1) + δ (C2N1H), v_s (COOH)
10	1308s	δ_{scis} (NH_2) + ρ_{tw} (NH_2), δ (CH_3)
11	1173w	v_a (C2-N3-C5) + δ (N3C3H)
12	1112w	v (N3- CH_3)
13	1052w	u_a (C2=N8) + v (C2-NH ₂)
14	982w	ρ_w (CH_2)
15	915w	v (C4-COOH) e/ou v (C4-COO ⁻)
16	811w	
17	707s	ρ_w (NH_2)
18	643s	$\delta_{esqueleto}$
19	465w	
20	420w	

Os espectros de creatina apresentam a predominância das bandas dos grupos $-NH_2$, $-COOH$ e os modos vibracionais envolvendo as ligações com nitrogênio. As bandas referentes aos grupos $-CH_2$ e $-CH_3$ apresentam intensidades moderadas a fracas.

Um grupo $-NH_2$ apresenta absorção do estiramento assimétrico, v_a (NH_2), em $3550-3330\text{ cm}^{-1}$ e do estiramento simétrico,

v_s (NH_2) em $3450-3250\text{ cm}^{-1}$. Existe uma relação empírica entre essas duas bandas (COLTHUP, DALY; WIBERLEY, 1990): $u_s = 345.5 + 0.876 v_a$. Sendo que $v_a > v_s$ e substituindo os valores experimentais, obtemos:

$$u_s = 345.5 + 0.876 (3407) = 3330\text{ cm}^{-1}.$$

Assim, atribuímos as bandas de 3407 e 3337 cm^{-1} como estiramento assimétrico da ligação NH, v_a (NH_2), e estiramento

simétrico da ligação NH, ν_s (NH₂), respectivamente.

As bandas de estiramento N-H geralmente surgem na região de número de onda acima de 3000cm⁻¹ livres das interferências das absorções do grupo -CH₂ e -CH₃. Assim, as bandas de estiramentos dos grupos -NH₂, muitas vezes são usadas para a identificar a presença de creatina em tecidos biológicos (REHMAN *et al.*, 2007).

A região de absorção do estiramento da ligação OH do ácido carboxílico depende



Fig. 7 - Estrutura de ressonância do ácido carboxílico (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990).

Atribuímos o alargamento de banda envolvendo a região de 3300-2600 cm⁻¹ como contribuição do estiramento da ligação OH devido à associação na forma de dímeros.

A dimerização do ácido carboxílico apresenta centro de simetria como é mostrada na Fig. 6. A maioria do dímero de ácido carboxílico possui uma banda de estiramento assimétrico da ligação C=O, ν_a (C=O) em Infravermelho em 1720-1680 cm⁻¹. O estiramento simétrico da mesma ligação, ν_s (C=O) poderá ser vista no espectro Raman na região de 1680-1640cm⁻¹ (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990).

Atribuímos a banda em 1698cm⁻¹ como sendo o estiramento assimétrico da ligação C=O, ν_a (C=O), no grupo COOH e sua intensidade é forte devido a contribuição

do tipo de associação: 3550-3500cm⁻¹, monômero, geralmente na forma estreita e 3000-2500cm⁻¹ dímero, na forma alargada. Geralmente, os ácidos carboxílicos nos estados líquido e sólido são dímeros através da ligação de hidrogênio como está mostrado na Fig. 6. A contribuição da estrutura de ressonância produz uma diminuição muito grande no número de onda (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990).

da estrutura de ressonância apresentada na Fig. 7.

Podstawka *et al.* (2007) encontram uma banda em 1615cm⁻¹, Mitewa, Enchev e Bakalova (2002) em 1600cm⁻¹ e os resultados de cálculo realizados por Ramos *et al.* (2006) para composto semelhante encontraram 1605cm⁻¹. Todos atribuíram com sendo deformação angular no plano no grupo - NH₂ conhecida como tesoura “scissor”, δ_{scis} (NH₂). Esse modo de vibração geralmente tem intensidade forte com a forma estreita no espectro Infravermelho e ajuda na sua identificação. Atribuímos a banda de 1618cm⁻¹ como sendo δ_{scis} (NH₂), em concordância com os autores citados.

Abaixo de 1400 cm⁻¹ há muitas discrepâncias nas atribuições encontradas na literatura. Em consequência do acoplamento entre os modos vibracionais de

estiramento e de deformação, as bandas em 1404, 1308, 1173, 1052 e 982 cm^{-1} não podem ser interpretados como modos puros. É necessário realizar o cálculo da distribuição de energia potencial (PED) para verificar a percentagem da contribuição de cada modo vibracional.

5. CONCLUSÕES

As bandas mais intensas de creatina são 1698, 1615, 1404/1397 cm^{-1} atribuídas como ν (C=O) no grupo -COOH, δ_{scis} (NH_2), [ν (C2-N1) + δ (C2N1H)] e/ou ν_s (COOH). Os espectros infravermelhos mostram a importância dos grupos - NH_2 , -COOH e das ligações com nitrogênio.

O alargamento de bandas na região de 3300-2600 cm^{-1} e a diminuição de número de onda do estiramento da ligação C=O reforçam a hipótese da formação de dímero através da ligação OH.

Na região de 1400 a 900 cm^{-1} , devido ao forte acoplamento entre os modos de estiramento e de deformação, não é possível interpretar cada banda espectral como correspondente a um único modo de vibração.

Uma análise em coordenadas normais dos modos vibracionais da molécula de creatina, que inclua o cálculo da distribuição de energia potencial (PED) entre os diferentes modos de vibração, seria útil para se ter uma interpretação mais completa do espectro da molécula em estudo.

6. AGRADECIMENTO

Agradecemos Juvalina Rosemberg Pereira pelo auxílio técnico na preparação

de amostras.

REFERÊNCIAS

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1767, p. 1073-1101, 2007.

BITTL, J. A.; DELAYRE J.; INGWALL, J. S. Rate equation for creatine kinase predicts the in vivo reaction velocity: 31P NMR surface coil studies in brain, heart, and skeletal muscle of the living rat, *Biochemistry*, v. 26, p. 6083-6090, 1987.

BITTL, J. A.; INGWALL, J. S. Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart, *Journal of Biological Chemistry*, v. 260, p. 3512-3517, 1985.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd. ed. New York; London: Academic Press, 1990, p.260, 278.

DOU, X. *et al.* Quantitative analysis of metabolites in urine using a highly precise, compact near-infrared Raman spectrometer, *Vibrational Spectroscopy*, v. 13, p. 83-89, 1996.

GALLANT, M. *et al.* Focally elevated creatine detected in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice and Alzheimer disease brain tissue, *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 5-8, 2006.

MITEWA, M.; ENCHEV, V.; BAKALOVA, T. Spectroscopic and quantum chemical study of the structure of a new paramagnetic dimeric palladium (II, III) complex with creatine, *Journal of Molecular Structure*, v. 609, p. 61-65, 2002.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.

- U. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, p. 134-179, 2008.
- NAKAE, I. *et al.* Proton magnetic resonance spectroscopy can detect creatine depletion associated with the progression of heart failure in cardiomyopathy, *Journal of the American College of Cardiology*, v. 42, p. 1587-1593, 2003.
- NASCIMBEN, L. *et al.* Creatine kinase system in failing and non failing human myocardium. *Circulation*, v. 94, p. 1896-1901, 1996.
- NEUBAUER, S. *et al.* Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy, *Circulation*, v. 96, p. 2190-2196, 1997.
- NISSEN, S. L.; SHARP, R. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis, *Journal of Applied Physiology*, v.94, p. 651-659, 2003.
- PODSTAWKA, E. *et al.* Food additives characterization by infrared, Raman, and surface-enhanced Raman spectroscopies, *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 38, p. 356-363, 2007.
- RAMOS, J. M. *et al.* FT-IR vibrational spectrum and DFT: B3LYP/6-31G structure and vibrational analysis of guanidinoaceticserinenickel (II) complex: [Ni(GAA)(Ser)], *Spectrochimica Acta, Part A*, v. 67, p. 1037-1045, 2007.
- REHMAN, S.; MOVASAGHI, Z.; TUCKER, A. T.; JOEL, S. P.; DARR, J. A.; RUBAN, A. V.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopic analysis of breast cancer tissues: identifying differences between normal, invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ of the breast tissue. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 38, n. 10, p. 1345-1351, 2007.
- TWARDOWSKI, J.; ANZENBACHER, P. Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry, New York: Ellis Horwood, 1994, p.20-22.
- WILSON, E. B., DECIUS, J. C., CROOSS, P. C. Molecular Vibrations. New York: McGraw-Hill, 1980.
- ZIMMER, H-G. *et al.* Synthesis of myocardial adenine nucleotides in the rat: acceleration during recovery from oxygen deficiency, *Circulation Research*, v. 32, p. 635-642, 1973.