Universidade de São Paulo

Instituto de Física

Departamento de Física Experimental

**Caracterização estrutural e óptica de lipoproteínas
humanas nativas e oxidadas**

Priscila Ribeiro dos Santos

Tese de doutorado apresentada ao Ins-
tituto de Física da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título
de doutora em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Antonio Martins Figueiredo Neto

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Martins Figueiredo Neto (IFUSP)

Profª. Dra. Iris Torriani (UNICAMP)

Prof. Dr. Oscar Nassif Mesquita (UFMG)

Prof. Dr. Luiz Juliano Neto (UNIFESP)

Prof. Dr. Paulo Alberto Nussenzveig (IFUSP)

São Paulo
2013

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Santos, Priscila Ribeiro dos

Caracterização estrutural e óptica de lipoproteínas humanas nativas e oxidadas. – São Paulo, 2013.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física, Departamento de Física Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Martins Figueiredo Neto

Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Física da matéria condensada; 2. Física experimental; 3. Estrutura da matéria; 4. Óptica; 5. Lipoproteína.

USP/IF/SBI-076/2013

“Não são as experiências que temos na vida que nos tornam sábios, mas sim nossas reflexões sobre elas.”

Jane Fonda (tradução livre)

Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
1 Introdução	1
2 Caracterização óptica das lipoproteínas	9
2.1 A técnica de Varredura-Z	10
2.2 O modelo de Lente Térmica	13
2.3 Descrição experimental	16
2.3.1 Separação das lipoproteínas	16
2.3.2 Oxidação <i>in vitro</i> de lipoproteínas	17
2.3.3 Varredura-Z	19
2.3.4 Absorção linear	24
2.3.5 Calorimetria	25
2.3.6 Coeficiente termo-óptico e densidade	27
2.3.7 Cromatografia líquida de alta performance	27
2.4 Resultados e análise de dados	30
2.4.1 Varredura-Z	30
2.4.2 Absorção linear	37
2.4.3 Calorimetria	41
2.4.4 Coeficiente termo-óptico e densidade	43
2.4.5 Cromatografia líquida de alta performance	45
2.4.6 Difusividade térmica	47
2.5 Sumário dos resultados de caracterização óptica das lipoproteínas	49

3	Caracterização estrutural das lipoproteínas	53
3.1	A técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos	55
3.2	Estratégia para a análise de dados	60
3.2.1	Método da transformada de Fourier inversa	60
3.2.2	Método de generalização da transformada de Fourier inversa	61
3.2.3	Análise do perfil de densidade eletrônica das amostras	64
3.3	Descrição experimental	68
3.3.1	Amostras	68
3.3.2	Medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos	69
3.3.3	Espalhamento de luz dinâmico	71
3.4	Resultados e análise de dados	72
3.4.1	Espalhamento de raios X a baixos ângulos	72
3.4.2	Espalhamento dinâmico de luz	90
3.5	Sumário dos resultados de caracterização estrutural das lipoproteínas	94
4	Sumário dos resultados, conclusões e perspectivas	97
A	Desenvolvimento do modelo de Lente Térmica	103
A.1	Dedução de ΔT	104
A.2	Determinação da distância focal da lente térmica	110
A.3	Modificação do feixe (laser) pela lente térmica	117
A.4	A propagação do feixe	120
B	Caracterização do feixe de laser utilizado no arranjo de Varredura-Z	129
C	Presença do cobre nas amostras de LDL: condição necessária porém não suficiente	135
	Referências	137
	Lista de abreviaturas	147
	Lista de figuras	147
	Lista de tabelas	154

Agradecimentos

Este trabalho é fruto de alguns anos de colaboração e convivência com diversas pessoas, às quais dedico meus sinceros agradecimentos.

Agradeço primeiramente ao Toninho pela orientação neste trabalho e pelas diversas conversas, discussões e ensinamentos relacionados à física, a como fazer pesquisa e à carreira acadêmica.

Gostaria de agradecer também aos vários colegas do Grupo de Fluidos Complexos que me ajudaram com discussões e ideias. Em especial agradeço à Andrea Monteiro, por separar todas as amostras de lipoproteínas utilizadas nesta tese e pela disposição em tirar todas as minhas dúvidas sobre doenças cardiovasculares e sistemas biológicos; ao Daniel Espinosa, por ter realizado as medidas de ZS das amostras de HDL e por diversas discussões sobre a técnica de Varredura-Z e o modelo de Lente Térmica; ao Fernando Batalioto, pelo programa de ajuste iterativo utilizado nas análises de ZS; ao Dennys Reis, pelas medidas de DLS das HDLs e pelas diversas conversas, sempre com informações preciosas; à Renata Bicev, pela grande ajuda nas análises de DLS das amostras de HDL e conversas sobre o futuro; ao Thiago Mattos, por me ajudar nas preparações de amostras, medidas com HPLC e análises desses resultados; ao Filipe Lima, pela ajuda nas medidas de DLS das amostras de LDL e análises dos resultados obtidos; ao professor Cristiano Oliveira, por me ensinar tudo o que sei sobre SAXS; por fim, à Juliana Peçanha e Ellen

Binotto, por todo o suporte administrativo.

Também agradeço aos professores Sayuri Miyamoto, Iolanda Cuccovia e Magnus Gidlund por disponibilizarem seus laboratórios em diversas ocasiões e ao professor Cristiano Mattos pela paciência e bom humor nas diversas discussões filosóficas que me ajudaram a ver o trabalho de doutorado e minhas possibilidades de futuro por uma outra ótica.

Agradeço ainda a todos os amigos e familiares que me apoiaram nestes anos de trabalho. Em especial, ao Diogo Tridapalli por estar sempre disposto a resolver minhas dúvidas de programação e ao Jairo Cavalcante e ao Gabriel de Barros pela leitura cuidadosa da primeira versão desta tese. Ao Jairo agradeço também pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas, por estar sempre junto e pela paciência em todas as discussões infinitas.

Durante o desenvolvimento deste trabalho a autora recebeu auxílio financeiro do CNPq.

Resumo

A aterosclerose, doença sistêmica caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos fibrosos nas artérias, é uma das principais causas de morte em diversos países. Partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidadas estão presentes nas lesões aterogênicas, evidenciando a correlação entre estas partículas e a doença aterosclerótica. Este trabalho apresenta estudos de caracterização óptica e estrutural de lipoproteínas humanas nativas e oxidadas *in vitro*. As caracterizações foram realizadas por meio de diversas técnicas, sendo as principais a Varredura-Z e o espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). Nos estudos de caracterização óptica verificou-se que a resposta não-linear das amostras de LDL está relacionada tanto com o seu conteúdo de antioxidantes, quanto com sua concentração de hidroperóxidos. Com relação à caracterização estrutural, foi proposto um novo método de análise para os dados de SAXS. Neste método, que mostrou-se mais adequado frente àqueles existentes na literatura, a curva de contraste de densidade eletrônica é obtida diretamente da curva de intensidade de espalhamento. Por meio das análises realizadas concluímos que as partículas de LDL apresentam pequenas alterações estruturais apenas quando comparamos a amostra nativa com aquela oxidada por 18 horas. São apresentados ainda alguns resultados exploratórios obtidos, tanto na caracterização óptica quanto na estrutural, para as lipoproteínas de alta densidade (HDL), que apontam para uma maior resistência deste tipo de lipoproteína ao processo oxidação. Por fim, é possível afirmar

que a técnica de Varredura-Z é sensível a mudanças que ocorrem no início do processo oxidativo das lipoproteínas, enquanto a técnica de SAXS é sensível a mudanças em estágios mais avançados do mesmo processo.

Abstract

Atherosclerosis, which is a systemic disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in the arteries, is a major cause of death in many countries. Particles of oxidized low density lipoproteins (LDL) are present in atherogenic lesions, showing the correlation between these particles and atherosclerosis. This thesis presents studies of structural and optical characterization of native and *in vitro* oxidized human lipoproteins. Characterizations were carried out by means of various techniques, the main ones being Z-scan (ZS) and small angle X-ray scattering (SAXS). In the optical characterization studies it was found that the non-linear response of LDL samples is associated with their antioxidant contents and with their concentration of hydroperoxides. With respect to the structural characterization, we propose a new method of analysis for the SAXS data. In this method, which is more suitable than those existing in the literature, the electron density curve is obtained directly from the scattering intensity curve. Through these analyses we conclude that LDL particles exhibit only small structural changes when native LDL sample is compared to the 18 hours oxidized one. We also present preliminary results, both in structure and in optical characterization, for the high density lipoprotein (HDL), which presents a greater resistance (comparing to LDL) to the oxidation process. Finally, it is possible to say that the ZS technique is sensitive to changes that occur in early stages of the lipoprotein's oxidative process, while the SAXS technique is sensitive to changes in

the later stages of the same process.

1

Introdução

O colesterol é uma molécula fundamental para a modulação da fluidez de membranas celulares e para a síntese de alguns hormônios e de vitamina D [1,2]. No corpo humano, o colesterol ingerido e o sintetizado pelo fígado (colesterol endógeno) juntam-se a outras estruturas formando complexos lipoproteicos (lipoproteínas). Essas partículas têm a função de solubilizar moléculas de colesterol e triglicérides, que são lipídios hidrofóbicos, para que possam ser transportados através da corrente sanguínea, tanto para o fígado quanto para as células receptoras.

As lipoproteínas podem ser classificadas de acordo com a sua densidade, tamanho e composição lipídica, conforme a tabela 1.1.

Tabela 1.1: Classificação e propriedades das lipoproteínas [2, 3].

Tipo de lipoproteína	Sigla	Principal lipídio	Apolipoproteínas	Densidade (g/cm ³)
Quilomícrons	não há	triglicerídios da dieta	B48, C, E	$d < 0,94$
lipoproteína de muito baixa densidade	VLDL	triglicerídios endógenos	B100, C, E	$d < 1,006$
lipoproteína de densidade intermediária	IDL	ésteres de colesterol endógenos	B100, E	$1,006 < d < 1,019$
lipoproteína de baixa densidade	LDL	ésteres de colesterol endógenos	B100	$1,019 < d < 1,063$
lipoproteína de alta densidade	HDL	ésteres de colesterol endógenos	A, D	$1,063 < d < 1,21$

As lipoproteínas têm estrutura tipo micelar: a superfície é formada por uma monocamada de fosfolipídios (principalmente fosfatidilcolina e esfingomiéline), colesterol livre e antioxidantes (sendo os principais, α -tocoferol e β -caroteno); o núcleo é hidrofóbico, formado por ésteres de colesterol e triglicérides, em diferentes proporções em cada lipoproteína [3]. Da mesma forma, todas elas têm pelo menos uma apolipoproteína que é responsável pela estabilidade estrutural da partícula. A quantidade e o tipo da apolipoproteína variam de um tipo de partícula para outro, como pode ser observado na tabela 1.1. As apolipoproteínas ficam com parte de sua estrutura na superfície da partícula e parte embebida no núcleo. Acredita-se que, no caso da LDL, entre 40 e 60% da área superficial da monocamada de fosfolipídios fique coberta pela apolipoproteína B100 (ApoB-100) [1].

A LDL é a lipoproteína mais abundante no plasma sanguíneo. Sua principal função é transportar o colesterol para os tecidos periféricos. Trata-se de uma partícula com diâmetro entre 19 e 25 nm. Cada LDL tem apenas uma proteína, a ApoB-100, que é composta por 4536 aminoácidos e massa aproximada de 550 kDa ($\approx 9 \times 10^{-19}$ g) [4]. A ApoB-100 tem várias funções, entre elas a de se ligar aos receptores das células-alvo. Quando a ligação

acontece a LDL é internalizada pela célula, liberando seu conteúdo lipídico.

Já a HDL tem a função de recolher o colesterol liberado no plasma pela morte celular e pela remodelação das membranas celulares e transportá-lo para o fígado (transporte reverso do colesterol). Essas partículas são muito heterogêneas, com diâmetros médios que podem variar entre 7 e 12 nm. A heterogeneidade está relacionada às diferentes apolipoproteínas que a HDL pode ter. Aproximadamente 70% do conteúdo proteico destas partículas é formado pela ApoA-I, que tem cerca de 28 kDa de massa ($\approx 4,65 \times 10^{-20}$ g) e é constituída por 176 aminoácidos [5].

Figura 1.1: Figura esquemática da estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL), adaptada de [6].

Tanto as lipoproteínas do tipo LDL quanto as lipoproteínas do tipo HDL podem ser classificadas em subfrações relacionadas à densidade e tamanho. Nos dois casos as partículas podem ser divididas em dois grupos principais: o das grandes (*large buoyant*) e o das pequenas e densas. As partículas do tipo LDL grandes têm densidade entre 1,019 e 1,041 g/cm³; e as do tipo pequenas e densas, entre 1,041 e 1,063 g/cm³ [7]. Por sua vez,

as partículas do tipo HDL grandes têm densidade entre 1,063 e 1,125 g/cm³; e as do tipo pequenas e densas, entre 1,125 e 1,21 g/cm³ [5].

Há uma correlação direta entre a quantidade de LDL no plasma sanguíneo e o desenvolvimento de aterosclerose, e uma correlação inversa entre a quantidade de HDL no plasma e o desenvolvimento da mesma doença [1, 8]. Por isso o ideal, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é ter um nível alto de HDL e baixo de LDL no plasma sanguíneo.

A aterosclerose é uma patologia sistêmica, essencialmente inflamatória, caracterizada pelo acúmulo de lipídios e elementos fibrosos nas artérias [9]. Em 2008, as duas principais causas de óbitos no mundo foram a doença isquêmica do coração (12,8%) e as doenças cerebrovasculares (10,8%) [12]. Ambas podem ser associadas à aterosclerose. No Brasil, em 2007, 70,6% dos óbitos foram causados por doenças cardiovasculares [13], que também podem estar associadas à doença aterosclerótica. A aterosclerose é uma das principais causas de morte em diversos países e por isso a compreensão de suas causas é de grande interesse social e acadêmico.

Partículas de LDL oxidadas (oxLDL) estão presentes nas lesões aterogênicas [10], porém os mecanismos pelos quais a LDL participa da formação das placas de ateroma ainda são controversos [11]. A teoria mais aceita atualmente prevê que a maior parte das partículas de LDL são oxidadas na túnica íntima do vaso sanguíneo (figura 1.2) e não na circulação. De acordo com essa teoria as partículas de LDL classificadas como pequenas e densas são consideradas mais aterogênicas do que as partículas de LDL do tipo grande, pois as pequenas e densas atravessam com mais facilidade a parede do vaso sanguíneo, chegando à túnica íntima. Por outro lado, pequenas quantidades, porém significativas, de LDL minimamente modificadas (mmLDL) são observadas no plasma de humanos saudáveis. A quantidade desse tipo de LDL aumenta no plasma de pacientes com doença coronariana, diabetes e doença renal [10].

O processo de oxidação da LDL é considerado um evento chave no início do desen-

Figura 1.2: Figura esquemática de uma artéria sadia e de uma artéria com aterosclerose. Artérias humanas de adultos saudáveis têm diâmetro tipicamente entre 1 e 10 mm.

volvimento da aterosclerose [14]. Ele é dividido em três fases que estão relacionadas à oxidação dos lipídios e fosfolipídios que compõem as partículas: iniciação, propagação e terminação (figura 1.3) [4]. No início do processo de oxidação os antioxidantes presentes na camada superficial da LDL são consumidos, preservando a integridade das partículas. Com a diminuição do conteúdo antioxidante, os lipídios que compõem as partículas começam a ser oxidados. Nesse momento a produção de dienos e peróxidos começa a aumentar. Esse é o início da fase de propagação. O processo evolui e os hidroperóxidos formados passam a se decompor em aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos, esta é a fase de terminação. Os produtos da oxidação causam modificações na ApoB-100, que, por sua vez, deixa de ser reconhecida pelo seu receptor. A partícula é então absorvida pelos macrófagos através de seus receptores *scavenger* (receptores que reconhecem a oxLDL). Esse quadro leva à absorção irregular de LDL pelos macrófagos e a formação de células espumosas, eventualmente resultando em uma estria gordurosa, que caracteriza a primeira fase de uma placa de ateroma [15]. A probabilidade da LDL oxidar-se em cada ser humano depende de fatores hereditários e ambientais, tais como tabagismo, hipertensão, obesidade e diabetes.

O processo de oxidação pode ser mimetizado em laboratório (oxidação *in vitro*). A oxidação *in vitro* da LDL pode ser realizada por meio da adição de Sulfato de Cobre II (CuSO_4) à solução de LDL. O tempo de oxidação *in vitro* necessário para se atingir cada

Figura 1.3: Fases de oxidação da LDL e de produtos de oxidação formados em função do tempo de oxidação *in vitro*. Figura adaptada de [4].

fase do processo de oxidação depende da amostra (por exemplo, do conteúdo antioxidante presente que está sujeito à dieta alimentar do indivíduo doador da amostra) e da quantidade e tipo de substância oxidante que é utilizada.

Aparentemente a aterosclerose está associada à oxLDL e não simplesmente à quantidade de LDL nativa (naLDL) presente na corrente sanguínea. A dificuldade em determinar diretamente a quantidade de oxLDL na circulação, associada à baixa quantidade de técnicas capazes de realizar esse tipo de quantificação levou o Grupo de Fluidos Complexos do Instituto de Física da USP (GFCx-IFUSP) a usar a técnica de Varredura-Z (ZS) e desenvolver uma abordagem física para atacar este problema [16,17]. Esta é uma abordagem inovadora pois do ponto de vista físico há estudos sobre a oxidação de lipoproteínas que utilizam técnicas como microscopia eletrônica, crio-microscopia eletrônica, calorimetria, óptica linear e espalhamento de raios X. Porém este problema nunca foi abordado através de técnicas de óptica não-linear. A caracterização óptica não-linear vem agregar informações sobre estes sistemas. Os estudos iniciais mostraram que a técnica de ZS é capaz de

diferenciar indivíduos saudáveis de doentes [18, 19]. Porém os motivos pelos quais a resposta ótica não-linear das partículas de LDL altera-se no processo de oxidação só começaram a ser compreendidos com o trabalho apresentado nesta tese de doutorado.

Em medidas de ZS na escala temporal térmica (ms), o sinal óptico não-linear está associado a: absorção linear, coeficiente termo-óptico, calor específico, difusividade térmica e densidade das amostras. O processo de oxidação das partículas do tipo LDL foi estudado em relação a todos esses parâmetros. Além disso, através da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), foi possível verificar a relação entre a mudança no sinal medido no ZS, o consumo dos antioxidantes presentes na LDL e o aumento da concentração de alguns produtos da oxidação. Foi possível verificar também que a técnica de Varredura-Z é sensível a mudanças na fase inicial do processo de oxidação da LDL. Essa sensibilidade é bastante interessante, visto que muitos dos testes bioquímicos não são capazes de identificar diferenças em amostras de lipoproteínas minimamente oxidadas.

Além de estudar a resposta óptica não-linear de amostras de lipoproteínas nativas e oxidadas, também foram estudadas suas características estruturais através da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Através da técnica SAXS, foram analisados os fatores de forma e estrutura e determinados os perfis de densidade eletrônica de amostras em diferentes graus de oxidação. As mudanças nas amostras observadas com a técnica SAXS são devidas a estágios de oxidação bem mais avançados do que aqueles observados nas medidas de ZS. A técnica de DLS foi utilizada para corroborar alguns dos resultados de SAXS.

O principal objetivo deste trabalho é compreender as mudanças que ocorrem na LDL durante seu processo de oxidação, por meio das técnicas mencionadas anteriormente. Como há uma relação complementar entre ela e a HDL, realizamos também alguns testes de caracterização desta lipoproteína, por meio das técnicas de Varredura-Z, espectrofotometria, SAXS e DLS.

Esta tese está dividida em quatro capítulos. O capítulo 2 apresenta, em detalhe, a parte

de caracterização óptica das amostras. Nele são discutidos a técnica da Varredura-Z, o modelo utilizado nas análises de dados, as metodologias empregadas e os resultados obtidos. No capítulo 3 estão descritos os métodos, modelos e resultados referentes à caracterização estrutural da LDL e da HDL. No capítulo 4 é feito um sumário dos resultados obtidos, são apresentadas as conclusões e algumas perspectivas. A tese apresenta ainda três apêndices: No apêndice A é apresentado o desenvolvimento do modelo de Lente Térmica em detalhe; o apêndice B apresenta a caracterização do laser utilizado no arranjo de Varredura-Z; já no apêndice C é mostrado que apenas a presença da solução de cobre utilizada nas oxidações *in vitro* não é condição suficiente para a mudança no sinal de ZS, é necessário que haja a oxidação da amostra.

2

Caracterização óptica das lipoproteínas

A caracterização óptica das partículas de LDL deu-se principalmente pela utilização da técnica de Varredura-Z. Complementarmente foi verificada a variação da absorção óptica linear, do coeficiente termo-óptico, da densidade e do calor específico em função do tempo de oxidação das amostras de LDL. No caso das partículas de HDL, foram realizadas medidas de Varredura-Z e da absorção óptica linear, também de amostras oxidadas e nativas. A descrição das técnicas utilizadas, com ênfase na de ZS, e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

2.1 A técnica de Varredura-Z

A Varredura-Z (ZS) é uma das técnicas que possibilitam medir, de forma simples e direta, os efeitos não-lineares que ocorrem na transmitância de um feixe de luz intenso através de um material. Essa técnica foi desenvolvida no final da década de 1980 por Sheik-Bahae e colaboradores [20, 21]. Desde seu desenvolvimento inicial, a Varredura-Z foi utilizada no estudo das propriedades ópticas não-lineares de materiais semicondutores e nanométricos [22–25], e mais recentemente no estudo de não-linearidades ópticas de materiais orgânicos [26]. Sua principal vantagem é a simplicidade do arranjo experimental (figura 2.1), aliada a uma grande sensibilidade.

Figura 2.1: Desenho esquemático do arranjo proposto por Sheik-Bahae e colaboradores [20].

Uma lente convergente focaliza um feixe laser de perfil gaussiano, pulsado em escalas que podem variar da ordem de segundos até a ordem de femtossegundos. A luz transmitida através da amostra passa por uma íris posicionada no campo distante e é coletada em função da posição (z) da amostra, por um detector posicionado logo após a íris. Como a luz laser é focalizada pela lente, a densidade de energia que atinge a amostra muda conforme sua posição no eixo z . Comparando a transmitância obtida com a amostra posicionada longe e perto do foco da lente, é possível verificar se o material estudado apresenta refração ou absorção óptica não-linear e, em caso positivo, seu comportamento.

Quando a amostra é iluminada por um feixe, só haverá resposta não-linear se a amostra e a luz interagirem. Na escala de milissegundos (escala temporal térmica), a região iluminada

Figura 2.2: Exemplo de uma amostra com $dn/dT < 0$. Neste caso, a amostra se comporta como uma lente divergente. As linhas tracejadas mostram a abertura do feixe sem a ação da amostra.

é aquecida ao absorver parte da energia do feixe. Durante o intervalo entre dois pulsos (feixe pulsado) consecutivos a amostra perde calor para o ambiente. No caso de um feixe com perfil gaussiano a amostra irá esquentar mais na região iluminada pelo centro do feixe; e menos, nas bordas. Esse comportamento gera um gradiente de temperatura que, conseqüentemente, gera um gradiente de índice de refração. Portanto os raios de luz que passam por diferentes pontos da amostra sofrem uma defasagem, fazendo com que ela se comporte como uma lente convergente ou divergente, dependendo de suas características. Se a variação no índice de refração em função da variação da temperatura, chamado coeficiente termo-óptico (dn/dT), for positiva, a amostra comportar-se-á como uma lente convergente; se for negativa, como uma lente divergente. A figura 2.2 ilustra este comportamento para uma amostra de $dn/dT < 0$, que é o caso das soluções de lipoproteínas LDL e HDL.

Esses efeitos, chamados de auto-focalização no caso da convergência do feixe e auto-desfocalização, no caso de sua divergência, serão mais acentuados quanto mais intenso for o feixe. Assim, se a amostra estiver posicionada longe do foco ($|z| \gg 0$) o efeito de

auto-(des)focalização será desprezível. Porém, conforme a amostra vai sendo posicionada mais próxima da região da cintura do feixe, a auto-(des)focalização vai tornando-se mais importante. No caso da amostra com $dn/dT < 0$ (figura 2.2), a intensidade de luz que passa pela íris e chega ao detector aumenta à medida em que a amostra se aproxima da posição $z = 0$ (foco) e chega a um máximo em uma posição próxima ao foco, porém na qual $z < 0$. Em $z = 0$ não há efeito de não-linearidade. Para $z > 0$ a intensidade de luz no detector passa a diminuir até atingir um ponto de mínimo (em uma região ainda próxima a $z = 0$), como pode ser observado na figura 2.3. Conforme a amostra é afastada da região focal, o efeito de auto-desfocalização vai perdendo intensidade, até se tornar desprezível novamente. Para o caso de uma amostra com $dn/dT > 0$ ocorre o oposto do que foi descrito acima.

Figura 2.3: Exemplo de curva de transmitância normalizada em função da posição da amostra. A curva vermelha representa o caso de uma amostra que se comporta como uma lente divergente ($dn/dT < 0$) e a curva azul, o caso de uma amostra que se comporta como uma lente convergente ($dn/dT > 0$).

2.2 O modelo de Lente Térmica

Para analisar os dados de transmitância não-linear das amostras de lipoproteínas, obtidos nas medidas de ZS na escala térmica (milissegundos), foi utilizado o modelo de Lente Térmica (LT). Esse modelo, que teve seu desenvolvimento iniciado na década de 1960 [27], descreve o comportamento de auto-(des)focalização devido ao aquecimento local da amostra pela ação do feixe. Inicialmente ele foi desenvolvido para medidas de transmitância óptica não-linear realizadas em uma única posição (z) do arranjo experimental. O modelo foi continuamente desenvolvido durante as décadas de 1970 e 1980, de forma a possibilitar a determinação da intensidade de luz transmitida pela amostra em função de sua posição em relação ao foco do feixe [28, 29]. O fenômeno de LT é vastamente utilizado, sendo aplicado em diversos campos do conhecimento como no estudo de reações químicas rápidas, nas propriedades de nanofluidos e de nanopartículas [30–32]. Nas aplicações de interesse biológico a LT já foi utilizada na investigação da morte de células vermelhas e na caracterização da resposta fototérmica de diversos tipos de células [33, 34].

Através do modelo de LT é possível determinar a distância focal (f) da lente formada pela amostra em função do tempo (t):

$$f(t) = \frac{\pi\kappa\omega^2(z)}{2,303PA(dn/dT)} \left[1 + \frac{t_{c0}}{2t} \right], \quad (2.1)$$

onde κ é a condutividade térmica da amostra, $\omega(z)$ é o raio do feixe na posição z , P é a potência do laser que incide sobre a amostra, A é a absorvância decádica e t_{c0} é uma constante de tempo característica da amostra.

A absorvância decádica é definida como $A = -\log_{10}(1 - \alpha \cdot L)$, onde α é a absorção linear da amostra no comprimento de onda da luz laser utilizada nas medidas de ZS e L é a espessura da amostra. Como $[\alpha] = 1/(\text{unidade de comprimento})$, $\alpha \cdot L$ é adimensional, bem como a absorvância decádica.

A intensidade normalizada de luz transmitida através da amostra pode ser escrita em função do tempo e de sua posição como [29]:

$$\frac{I(t)}{I(0)} = \left[1 + \frac{\theta}{(1 + t_c/2t)} \left(\frac{2(z/z_0)}{1 + (z/z_0)^2} \right) + \left[\frac{\theta}{(1 + t_c/2t)} \right]^2 \left(\frac{1}{1 + (z/z_0)^2} \right) \right]^{-1}, \quad (2.2)$$

onde θ é uma constante adimensional e z_0 é o comprimento Rayleigh do arranjo experimental, escrito como:

$$z_0 = \frac{\pi\omega_0^2}{\lambda}$$

onde λ é o comprimento de onda do laser e ω_0 , o raio do feixe na cintura.

θ e t_c são os parâmetros de ajuste do modelo de LT. t_c pode ser reescrito em função do tempo característico (t_{c0}), que está ligado ao tempo que a lente térmica demora para estabilizar-se na amostra.

$$t_c = t_{c0} \left[1 + \left(\frac{z}{z_0} \right)^2 \right].$$

É possível ainda escrever t_{c0} em função de ω_0 e da difusividade térmica D da amostra:

$$t_{c0} = \frac{\omega_0^2}{4D}.$$

Desta forma t_c pode ser escrito em função de parâmetros físicos da amostra e do arranjo experimental:

$$t_c = \frac{\omega_0^2}{4D} \left[1 + \left(\frac{z}{z_0} \right)^2 \right]. \quad (2.3)$$

Já o parâmetro θ , de acordo com o modelo de LT, pode ser escrito em função de características do arranjo experimental e de grandezas físicas características da amostra estudada:

$$\theta = \frac{2,303PA}{\lambda D \rho c_p} \left(-\frac{dn}{dT} \right), \quad (2.4)$$

onde ρ é a densidade da amostra e c_p é sua capacidade térmica a pressão constante. Desta forma podemos reescrever a equação 2.2 em função das características do arranjo e da amostra (equação 2.5), e assim obter diretamente as características físicas das amostras estudadas.

$$\frac{I(t)}{I(0)} = \left\{ 1 + \frac{2,303PA}{\lambda D \rho c_p} \left(-\frac{dn}{dT} \right) \frac{1}{\left(1 + \frac{\lambda z_0}{8\pi D t} [1 + (z/z_0)^2] \right)} \right. \\ \left. \left(\frac{2(z/z_0)}{1 + (z/z_0)^2} \right) + \left[\frac{2,303PA}{\lambda D \rho c_p} \left(-\frac{dn}{dT} \right) \frac{1}{\left(1 + \frac{\lambda z_0}{8\pi D t} [1 + (z/z_0)^2] \right)} \right]^2 \right. \\ \left. \left(\frac{1}{1 + (z/z_0)^2} \right) \right\}^{-1}. \quad (2.5)$$

Os detalhes do desenvolvimento do modelo de Lente Térmica estão descritos no apêndice

A. Essa forma de escrever a intensidade de luz transmitida possibilita a extração de parâmetros físicos da amostra a ser estudada.

Para que os parâmetros obtidos no ajuste dos dados sejam confiáveis é necessário respeitar os limites do modelo. A espessura da amostra deve ser fina se comparada com o comprimento Rayleigh do arranjo. Além disso a amostra deve ter baixa absorção de luz no comprimento de onda do feixe. A íris e o detector que coleta a luz transmitida devem ser posicionados no campo distante, isto é, a distância d entre a cintura do feixe e o detector deve ser muito maior do que o comprimento Rayleigh, de forma que podemos fazer a aproximação $d \rightarrow \infty$ (figura 2.1).

O modelo ainda considera que toda a radiação absorvida pela amostra é transformada em calor. O tempo característico t_{co} pode variar de dezenas de microssegundos até alguns segundos, dependendo do material estudado e do diâmetro do feixe laser utilizado. Esse tempo deve ser levado em conta na escolha da largura temporal do pulso de luz. O tempo de formação da lente térmica deve ser maior do que o tempo de subida do pulso de luz,

porém a lente precisa se estabilizar em um tempo menor do que o tempo total do pulso (tempo no qual a amostra é iluminada). O estado estacionário ocorre a partir do momento em que a taxa de aquecimento, que depende da potência do laser e da absorvância da amostra, é igual à taxa de perda de calor, que depende da condutividade térmica do meio material da amostra.

2.3 Descrição experimental

2.3.1 Separação das lipoproteínas

As lipoproteínas foram extraídas do sangue coletado de doadores clinicamente saudáveis. Após a coleta, o sangue é centrifugado por 10 minutos a 10^3 força-G com o objetivo de separar o plasma de sua parte sólida (plaquetas, hemácias, etc.), que, em seguida à separação, é descartada. Ao plasma são adicionados os conservantes benzamidina (2 mM), gentamicina (0,5%), cloranfenicol (0,25%), fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) (0,5 mM) e aprotinina (0,1 unit/mL).

O plasma é composto por várias substâncias, entre elas as lipoproteínas VLDL, IDL, LDL e HDL. A separação de cada tipo de lipoproteína do plasma é feita por diferença de densidade, em sucessivos processos de ultracentrifugação [35]. Para separar a LDL primeiramente a densidade da solução é ajustada para retirar do plasma tudo o que tiver densidade menor do que 1,019 g/mL, o que inclui a IDL, a VLDL e os quilomícrons. Em seguida é realizada uma ultracentrifugação por 20 horas, a 4 °C e 10^5 força-G em um rotor 75 Ti da *Hitachi Centrifuge*. O sobrenadante, composto por tudo o que possuir densidade menor do que 1,019 g/mL, é descartado. A solução resultante é ajustada ao limite superior da densidade da LDL (1,063 g/mL), que passa por uma nova ultracentrifugação com os mesmos parâmetros da primeira. O sobrenadante obtido, composto pelas partículas de LDL, é dialisado por 24 horas, a 4 °C, protegido da luz, em solução tampão fosfato (PBS)

em $\text{pH} \approx 7,4$, composto por NaCl 0,9%, Na_2HPO_4 0,2% e NaOH 0,38%.

Para separar a HDL, a solução restante (na qual o sobrenadante era a LDL) é ajustada ao limite superior da densidade da HDL (1,21 g/mL). A solução passa por uma nova ultracentrifugação (ainda com os mesmos parâmetros). Desta vez o sobrenadante contém as partículas de HDL. Da mesma forma que ocorre com a solução de LDL, a solução contendo as partículas de HDL é dialisada em solução tampão PBS, protegida da luz e do calor.

A concentração de LDL nas amostras pode ser determinada através do método do ácido bicinconínico (BCA), com albumina de soro bovino como padrão. As medidas foram realizadas com conjuntos comerciais da *Pierce*. Como cada partícula de LDL possui apenas uma proteína (ApoB-100), uma vez determinada a sua concentração, temos, indiretamente, a concentração de LDL na solução. Nas medidas de caracterização óptica utilizamos amostras com 1,0 mg de ApoB-100 por mL de solução.

Como a LDL tem apenas uma ApoB-100 por partícula, a partir da massa da ApoB-100, que é de aproximadamente 9×10^{-19} g [4], podemos calcular a concentração de LDL na amostra em número de partículas por mL de amostra. Para o caso da amostra contendo 1,0 mg de ApoB-100 por mL de solução, temos da ordem de 10^{15} partículas de LDL por mL de amostra.

No caso das HDLs não é possível determinar a concentração em número de partículas, pois essas lipoproteínas não têm um número fixo de apolipoproteínas por partícula. Para contornar esse problema, todas as amostras de HDL utilizadas neste trabalho foram separadas e estudadas de uma única vez.

2.3.2 Oxidação *in vitro* de lipoproteínas

A oxidação *in vitro* das lipoproteínas tem o objetivo de mimetizar aquela que ocorre *in vivo* [10], porém com a vantagem de ser controlada. Assim, é possível realizar estudos

com oxidações seriadas, de forma a acompanhar a evolução do processo de oxidação das lipoproteínas e as mudanças que ocorrem devido a ele.

As oxidações *in vitro* das partículas de LDL e HDL estudadas foram realizadas adicionando-se 20 μM de Sulfato de Cobre II (CuSO_4) por mg de proteína à solução com lipoproteínas (LDL ou HDL) dialisadas [36]. O composto LDL+ CuSO_4 foi mantido em estufa a 37°C por tempos entre 10 e 90 minutos, em intervalos de 10 minutos. Já o composto HDL+ CuSO_4 foi mantido a 37°C pelos períodos de 5, 30 e 60 minutos e 18 horas. Para bloquear as oxidações foi adicionada uma solução de EDTA 1 mM ao final do intervalo de tempo pré-determinado de cada amostra.

O processo de oxidação mediado por cobre dá-se em diversos passos (Equações I a VI). Inicialmente o Cu(II) reage com um hidroperóxido de lipídio (LOOH) pré-existente na amostra, gerando um radical hidroperóxido ($\text{LOO}^\cdot$) (equação I). Este radical reage com α -tocoferol (TOCH) ou com algum lipídio (LH) da amostra (equações II e III). Quando praticamente todo o α -tocoferol foi consumido, a produção de dienos conjugados e hidroperóxidos começa a aumentar, marcando o fim da fase de iniciação e o início da fase de propagação do processo de oxidação. A partir desse momento os radicais peróxidos começam a reagir, principalmente, com outras moléculas de lipídios, produzindo mais hidroperóxidos (equações III e IV). Ao mesmo tempo o Cu(I) reage com os hidroperóxidos de lipídios, em uma reação tipo Fenton (equação V), gerando radicais livres, que dão origem a mais hidroperóxidos. O processo de oxidação desenvolve-se até a decomposição dos hidroperóxidos em aldeídos, cetonas, hidróxidos e hidrocarbonetos, a chamada fase de terminação. Passar pelas três fases do processo pode levar várias horas.

Para aumentar o controle sobre o processo, tanto no caso das amostras de LDL, quanto das de HDL, as oxidações foram realizadas a partir de uma amostra “mãe” nativa. Essa amostra foi dividida em alíquotas que foram incubadas por tempos pré-determinados.

2.3.3 Varredura-Z

Arranjo experimental

O arranjo experimental utilizado nas medidas de ZS descritas neste trabalho é composto por um laser de Nd:YVO₄, de luz verde ($\lambda = 532$ nm), contínuo (CW), com perfil gaussiano (modo TEM₀₀) (*Coherent* modelo Verdi V10). O perfil transversal do feixe pode ser observado na figura B.1. São usadas duas lentes convergentes, que chamaremos de $L1$ e $L2$, da *Newport* com diâmetro de 50,8 mm e respectivas distâncias focais de 100 e 80 mm. Essas lentes são posicionadas de forma que os focos das duas coincidam. $L1$ converge o feixe, que chega ao seu diâmetro mínimo e passa a abrir novamente. No ponto entre $L1$ e $L2$, onde o feixe atinge seu raio mínimo, é posicionado um obturador mecânico (*chopper*) (*Stanford Research Systems*, modelo SR540) que bloqueia o feixe periodicamente, proporcionando pulsos quadrados. A posição do *chopper* no foco faz com que o tempo de subida e descida dos pulsos seja o menor possível. Para as medidas com amostras de lipoproteínas o *chopper* é utilizado na frequência de 17 Hz, o que resulta em pulsos de aproximadamente 40 ms. Após $L2$, o feixe passa por dois espelhos, $E1$ e $E2$ (*Newport*, diâmetro de 25,4 mm). Os espelhos são utilizados para mudar a direção do feixe de forma que haja espaço para

Figura 2.4: Figura esquemática do arranjo experimental de ZS.

o detector ser posicionado no campo distante. Próximo a $E2$ é posicionada uma outra lente convergente, $L3$, chamada de lente de ZS. A lente de ZS é utilizada para causar a mudança de densidade de energia ao longo da direção z . Em nosso arranjo é utilizada uma lente da *Newport* de distância focal 150 mm e 25,4 mm de diâmetro. Em seguida é posicionado o microdeslocador (modelo M-UTM 150PP.1, *Newport*), que movimenta a amostra no eixo z . No final do microdeslocador há um divisor de feixe (também da *Newport*) que desvia metade da luz para um segundo detector utilizado para fazer medidas de absorção não-linear. Essa parte do arranjo não será utilizada e, por esse motivo, não será descrita. A aproximadamente 1270 mm do divisor de feixe é posicionada uma íris e logo atrás um fotodetector de Si, $D1$ (*THORLABS*, modelo PDA50). O detector fica conectado a um osciloscópio da *Tektronix*, modelo TDS1002B, que envia o sinal recebido para o microcomputador de aquisição. A figura 2.4 apresenta um esquema do arranjo experimental.

Para determinar a potência do laser que atinge a amostra é utilizado um *Power Meter*

(modelo 1815-C) acoplado a um fotodiodo de Silício (modelo 818-SL), ambos fabricados pela *Newport*.

Nos experimentos com as amostras de LDL a potência do feixe foi ajustada para que se obtivessem curvas de ZS nas quais a variação pico-vale fosse a máxima possível, dentro do limite da técnica, isto é, a transmitância normalizada deve ficar entre 1,20 e 0,80. Desta forma, a potência incidente nas amostras de LDL variou entre $121,9 \pm 1,0$ e $153,1 \pm 1,0$ mW, sendo as medidas das amostras mais oxidadas aquelas que utilizaram potência mais alta. As soluções de LDL foram acondicionadas em porta-amostra composto por duas lâminas de vidro espaçadas por uma folha de teflon[®] de 200 μm de espessura. Em todas as medidas com soluções de HDL foi possível manter a potência incidente constante em 180 mW. Para estas amostras foram utilizados porta-amostras com 1 mm de espessura para que fosse possível obter o sinal de ZS.

O apêndice B apresenta algumas características do feixe gaussiano utilizado nas medidas de ZS. Há ainda uma descrição de como foram realizadas as medidas para determinação do parâmetro z_0 do arranjo e uma pequena discussão que embasa a decisão de não utilizarmos um filtro epial.

Aquisição e tratamento de dados

A aquisição de dados dos experimentos de ZS e o controle do microdeslocador, que move a amostra no arranjo, são realizados através do programa de aquisição *zscan_chopper_new*, versão 2.0, desenvolvido no próprio Grupo de Fluidos Complexos do IF-USP. O programa coleta os dados de tensão em função do tempo no canal do osciloscópio que está ligado ao detector *D1* (figura 2.4).

A partir do programa de aquisição é possível definir o intervalo z entre duas posições consecutivas da amostra, assim como seu deslocamento total em uma medida completa. Além disso, também é possível definir quantas medidas devem ser efetuadas pelo osciloscópio em cada posição.

Ao construirmos gráficos da intensidade de luz transmitida em função do tempo, chamadas de curvas de dependência temporal (z fixo e t variável), em alguma das posições que a amostra percorre, vemos pulsos como os da figura 2.5. É importante ressaltar que conforme a lente térmica estabiliza-se, a intensidade da luz transmitida torna-se constante. Podemos observar nas figuras 2.5b e 2.5c que a intensidade de luz transmitida muda significativamente no início do pulso e depois tende a um valor constante.

Para gerar as curvas típicas de ZS dependentes da posição (pico-vale ou vale-pico) é necessário efetuar uma normalização dos dados da aquisição, pois as equações 2.2 e 2.5 devem ser utilizadas em função de $I(t)/I(0)$. Desta forma, é necessário escolher o instante de tempo, dentro da largura temporal do pulso, no qual será normalizada a intensidade de luz transmitida ($I(t)$). O tempo da normalização é escolhido arbitrariamente dentro de um intervalo no qual a lente térmica já está estabilizada. Além disso, é necessário subtrair a intensidade de fundo (I_f) tanto de $I(t)$ quanto de $I(0)$. A normalização fica então:

$$\Gamma_n(z) = \frac{I_t - I_f}{I_0 - I_f} \quad (2.6)$$

Tanto no caso das amostras de LDL quanto no das amostras de HDL, as normalizações foram realizadas com $I(t = 30 \text{ ms})$, o que corresponde aproximadamente a três quartos do tempo total do pulso.

Foram realizadas cerca de 10 medidas da transmitância em cada posição z da amostra e entre 80 e 100 posições no eixo z em cada medida. O primeiro passo da redução dos dados é calcular a média e o desvio padrão da média das várias medidas para uma mesma posição. Após o cálculo da média e do desvio padrão da média é feita a normalização, conforme a equação 2.6, em cada posição z para qual foi obtida uma curva de dependência temporal. Com os valores de transmitância normalizada para cada posição z constrói-se a curva de dependência espacial.

O ajuste do modelo de lente térmica foi realizado utilizando um método iterativo,

Figura 2.5: As figuras **a**, **b** e **c** são gráficos de intensidade de luz transmitida em função do tempo. Na figura **a** é possível observar um pulso transmitido com a amostra posicionada longe da cintura do feixe (no caso, $z = -45 \text{ mm}$). Nas figuras **b** e **c** podemos observar pulsos de luz transmitidos com a amostra posicionada próxima à cintura do feixe, $z = -7 \text{ mm}$ e $z = 6 \text{ mm}$, respectivamente. Por termos um aumento da intensidade de luz transmitida antes do foco e uma diminuição após, inferimos que esta é uma amostra com $dn/dT < 0$.

também desenvolvido pelos técnicos do GFCx-IFUSP, que utiliza não somente a curva de transmitância com dependência espacial, mas também da ordem de trinta curvas de transmitância com dependência temporal. Desta forma o resultado é o par $(\theta \text{ e } t_c)$ que melhor se ajusta ao conjunto de dados de cada amostra.

2.3.4 Absorção linear

O arranjo de espectrofotometria utilizado nas medidas de absorção linear das amostras de LDL e HDL é composto por uma fonte de luz (*Mikropack*, modelo DH-2000-BAL), por um porta-amostras e por dois espectrofotômetros (*Ocean Optics*, modelo USB4000).

A fonte de luz é composta por duas lâmpadas, sendo uma de deutério e outra de halogênio, que juntas cobrem o intervalo de espectro de radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre 200 e 1100 *nm*.

São utilizadas fibras ópticas para direcionar a luz emitida na fonte para o porta amostras e a luz transmitida através da amostra para os espectrofotômetros. A intensidade de luz transmitida referente a cada comprimento de onda é transformada em um sinal elétrico que é enviado ao microcomputador de aquisição. A aquisição e o tratamento inicial dos dados são realizados pelo programa de aquisição *SpectraSuite* versão 1.4.2.09, também da *Ocean Optics*.

O programa de aquisição pode ser utilizado em modo de medida de transmissão ou absorção óptica linear. Nos dois modos é feita a medida de porcentagem de transmissão de radiação ($\%T$) de acordo com a expressão:

$$\%T(\lambda) = \frac{I_T(\lambda) - I_f(\lambda)}{I_0(\lambda) - I_f(\lambda)} \times 100\%, \quad (2.7)$$

onde I_T é a intensidade de radiação transmitida através da amostra, I_f é a intensidade da radiação de fundo e I_0 , a intensidade de radiação de referência, aquela que corresponde a 100% de transmissão.

Os valores de I_f e I_0 devem ser armazenados no início da medida. Para determinar a intensidade da radiação de fundo é realizada uma medida com as lâmpadas desligadas. Já para determinar a intensidade I_0 é realizada uma medida com as lâmpadas ligadas, a cubeta posicionada dentro do porta-amostras e, se for o caso, com o material que será utilizado como referência (branco) dentro da cubeta.

Quando se escolhe o modo de medida de absorção óptica linear, após o cálculo da transmitância (equação 2.7) o programa de aquisição utiliza a expressão 2.8 para determinar o coeficiente de absorção linear da amostra em função do comprimento de onda.

$$\alpha(\lambda) = \frac{1}{L_c} \left[\log_{10} \left(\frac{100}{\%T(\lambda)} \right) \right] \quad (2.8)$$

onde L_c é a espessura da amostra na cubeta. As cubetas utilizadas têm 10 mm de espessura e volume mínimo de 150 μL (*Hellma*, modelo QS).

2.3.5 Calorimetria

As medidas de calor específico a volume constante (c_v) foram realizadas apenas para as amostras de LDL. O arranjo experimental era composto por uma unidade de controle de fluxo modelo FC-60A, um calorímetro diferencial de varredura (DSC), modelo DSC-60, e um módulo de análise térmica modelo TA-60-WS, todos da *Shimadzu Corporation*. A aquisição foi feita pelo programa *TA60WS Aquisition* versão 2.20 da mesma empresa.

Para realizar medidas com o DSC são necessários dois porta-amostras: sendo um deles o que contém a amostra e o outro, com um material de referência, que não deve apresentar transição de fase na faixa de temperatura de interesse. Os dois porta-amostras são posicionados no prato detector. O bloco térmico é aquecido de acordo com os valores de temperatura inicial (T_i), temperatura final (T_f) e rampa de subida programados na aquisição. São medidas, em função do tempo, a temperatura da amostra (T_a) e o desvio desta em relação à temperatura da referência, isto é, $\Delta T = T_a - T_r$, onde T_r é a temperatura

no porta-amostras de referência.

Nos experimentos com soluções contendo LDL o material de referência utilizado foi o próprio ar. Na equação 2.4 vemos que θ depende do calor específico a pressão constante (c_p), contudo o equipamento de DSC mede o calor específico a volume constante (c_v). As partículas de LDL e HDL estão imersas em solução principalmente composta por água, que em condições normais de temperatura e pressão, tem $c_p \approx c_v$. Para respeitar a aproximação $c_p \approx c_v$, as medidas de c_p foram realizadas no intervalo de temperatura entre 25 e 45 °C, no qual a expansão da amostra pode ser considerada desprezível. Em todas as medidas foram utilizadas rampas de temperatura de 5 °C/min e fluxo de nitrogênio de 100 mL/min. Para cada amostra de LDL foram realizadas três medidas. O calor específico das soluções de HDL não foi medido.

O programa de aquisição gera arquivos texto com três colunas: tempo (t), temperatura (T) e potência (P) utilizada para aquecer a amostra. Conforme a equação 2.9, para determinar c_p é necessário medir a massa (m) da amostra colocada no porta-amostras. Teremos então uma reta cujo coeficiente angular corresponde ao seu calor específico (equação 2.10):

$$P \cdot \Delta t = c_p m \Delta T, \quad (2.9)$$

$$P(t - t_0) = c_p m (T - T_0),$$

$$P \cdot t = c_p m T + (P \cdot t_0 - c_p m T_0), \quad (2.10)$$

onde t_0 é o tempo inicial e T_0 é a temperatura inicial.

Aos dados de cada uma das medidas foi ajustada uma reta. Foi determinado um valor médio de c_p para cada tempo de oxidação.

2.3.6 Coeficiente termo-óptico e densidade

As medidas de refratometria e densidade também só foram realizadas para as amostras de LDL. Para determinar o coeficiente termo-óptico das amostras de LDL foi utilizado um refratômetro analógico modelo 3T da *Atago*, conectado a um sistema de aquecimento e refrigeração a água, modelo F-12 da *Julabo*. A temperatura do refratômetro variou entre 25 e 45 °C.

Foram feitas medidas do índice de refração em função da temperatura da amostra. O valor de dn/dT é obtido através do coeficiente angular de uma função linear ajustada aos dados. Por utilizar uma grande quantidade de amostra, apenas duas amostras de LDL foram investigadas: a naLDL e a amostra de LDL oxidada por 90 minutos. Cada uma delas foi medida duas vezes.

A densidade das amostras de soluções contendo LDL foi determinada utilizando picnômetros com volumes bem definidos que variaram entre 500 e 530 μL . Para determinar a massa das amostras nos picnômetros foi utilizada uma balança digital com precisão de 0,1 mg (*Mettler*, modelo AE-240).

2.3.7 Cromatografia líquida de alta performance

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi utilizada para quantificação de antioxidantes (tocoferóis e carotenóides) e hidroperóxidos apenas nas amostras de LDL. Para cada tipo de quantificação foi utilizada uma metodologia diferente, porém o cromatógrafo foi o mesmo em todas as medidas: HPLC Nexera da *Shimadzu*, equipado com um detector composto por uma cadeia de fotodiodos. Essas medidas foram realizadas em colaboração com o Grupo de Pesquisa de Lipídios Modificados do Instituto de Química da USP.

Medidas da concentração de hidroperóxidos

O teor de lípidos das amostras de naLDL e oxLDL foi extraído de acordo com a metodologia Bligh e Dyer [37]. Resumidamente, metanol e clorofórmio contendo 1 mM de di-terc-butil metil fenol (BHT) foram adicionados a cada amostra de LDL. A mistura resultante foi centrifugada a 10^4 força-G durante 10 minutos e a fase superior descartada. Cada amostra foi concentrada, ressuspensa em $50 \mu\text{L}$ e injetada no HPLC. O protocolo do HPLC consistiu em um gradiente de água (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente foi: 90% de B durante 10 min, subida de 90% para 100% de B em 1 minuto, 100% de B por 19 minutos, descida de 100% para 90% de B em 1 minuto e 90% de B durante 9 minutos (tabela 2.1).

Tabela 2.1: Gradiente da metodologia Bligh e Dyer para quantificação dos ésteres de colesterol, fosfolipídios e os respectivos hidroperóxidos presentes nas amostras de LDL.

Gradiente	tempo (min)
B: 90%	10
B: 90% $\rightarrow$ 100%	1
B: 100%	19
B: 100% $\rightarrow$ 90%	1
B: 90%	9

As separações foram realizadas em uma coluna da *Phenomenex* modelo Luna C8 de 4,6 mm de diâmetro por 150 mm de comprimento. O fluxo da coluna foi ajustado para 1,0 mL/min e em cada injeção foram utilizados $10 \mu\text{L}$ de amostra. A pressão máxima foi de 250 kgf/cm^2 . Ésteres de colesterol não oxidados (Ch) e fosfolipídios (PL) foram monitorados em 205 nm. Os hidroperóxidos respectivos (ChOOH e PLOOH) foram monitorados em 235 nm.

Análise de tocoferóis e carotenóides

O teor de antioxidante das amostras de LDL foi extraído e analisado de acordo com o método proposto por Hatam e Clayden [38]. Neste método adiciona-se uma solução de 60% de NaOH, etanol e 6% de pirogalol a 100 μL de amostra de LDL. Em seguida as amostras são incubadas por 30 minutos a 70 °C. No final desta incubação é adicionado à amostra 1 mL de NaCl a 1% e 1 mL de uma mistura de acetato de etila:hexano (1:9 v/v) e recuperada a fase orgânica. As amostras são secas com N_2 , ressuspendidas em 100 μL de metanol:etanol (1:1 v/v) e injetadas no HPLC. O protocolo de HPLC consistiu de um gradiente de acetonitrila:água (9:1 v/v) (solvente A) e metanol:isopropanol (7:3 v/v) (solvente B). O gradiente foi: 10% de B durante 30 segundos, subida de 10% para 85% de B em 2,5 minutos, 85% de B durante 3,5 minutos, descida de 85% para 10% de B em 12 segundos e 10% de B durante 3,3 minutos (tabela 2.2).

Tabela 2.2: Gradiente da metodologia Hatam e Clayden para quantificação dos antioxidantes presentes nas amostras de LDL.

Gradiente	tempo (s)
B: 10%	30
B: 10% $\rightarrow$ 85%	150
B: 85%	210
B: 85% $\rightarrow$ 10%	12
B: 10%	200

As separações foram realizadas em uma coluna da *Shim-pack* modelo XR-ODS com 2 mm de diâmetro por 75 mm de comprimento. O fluxo foi ajustado para 0,45 mL/min e em cada injeção foram utilizados 10 μL de amostra. O teor de α -tocoferol foi monitorado em 298 nm e o de β -caroteno, em 471 nm.

2.4 Resultados e análise de dados

2.4.1 Varredura-Z

Lipoproteína de baixa densidade

A figura 2.6a apresenta duas curvas médias típicas da dependência temporal da transmitância normalizada de uma amostra de naLDL, uma em $z > 0$ e outra em $z < 0$. Os ajustes apresentados foram obtidos pelo método iterativo, utilizando a equação 2.5. A curva da dependência espacial da mesma amostra de naLDL (também com o ajuste da equação 2.5) pode ser observada na figura 2.6b. Esta mesma figura apresenta ainda as curvas de evolução espacial das amostras oxidadas por 60 e 90 minutos para fins de comparação. Verificamos que as soluções de LDL não apresentam absorção não-linear. O modelo de LT utilizado consegue descrever boa parte da física envolvida no experimento realizado, entretanto, há uma discrepância entre os pontos experimentais e o modelo, particularmente nas regiões anteriores e posteriores ao pico e ao vale, respectivamente.

Figura 2.6: a) Curva média típica da dependência temporal da transmitância normalizada da amostra de naLDL em $z = +15$ mm (vermelha) e $z = -15$ mm (azul). O foco está em $z = 0$ mm. b) Curvas médias da dependência espacial da transmitância normalizada das amostras naLDL, 60 minutos oxLDL e 90 minutos oxLDL. Nos dois gráficos as linhas contínuas são os ajustes iterativos obtidos com a equação 2.5.

Figura 2.7: Parâmetro θ (ajustado por meio da equação 2.2 e normalizado pela potência incidente do laser) em função do tempo de oxidação *in vitro* das partículas de LDL. As barras de erro dos valores de θ ajustados foram estimadas apenas a partir dos ajustes e não levam em conta outras possíveis fontes de erro. Elas não aparecem por serem menores do que os pontos.

A partir dos ajustes obtidos com a equação 2.2 podemos verificar como os parâmetros θ e t_{c0} variam em função dos tempos de oxidação das amostras. A evolução de θ é apresentada na figura 2.7. Os valores de θ apresentados estão divididos pela potência do feixe incidente nas amostras, pois, como mostrado anteriormente, θ depende da potência do laser incidente na amostra (equação 2.4). Mesmo normalizado pela potência incidente, o parâmetro θ diminui conforme o grau de oxidação da amostra aumenta. Este resultado está de acordo com os resultados anteriores encontrados pelo GFCx-IFUSP [16–19].

Com relação aos resultados obtidos para o parâmetro t_{c0} , apresentados na figura 2.8, pode-se observar que não variaram de forma significativa em função do tempo de oxidação das amostras, indicando, portanto, não ser um bom parâmetro para verificar o grau de oxidação das amostras.

Figura 2.8: Parâmetro t_{c0} (obtido através do ajuste da equação 2.2) em função do tempo de oxidação *in vitro* das amostras de LDL.

Para verificar que a simples adição de CuSO_4 não é responsável pela mudança observada no sinal não-linear das amostras de LDL, foram realizados testes, cujos detalhes e resultados são apresentados no apêndice C.

Contribuições das diferentes moléculas que constituem a LDL em seu sinal óptico não-linear

Além de verificar como o sinal da Varredura-Z evolui com a oxidação das LDLs, foram realizadas algumas medidas com a intenção de se determinar quais constituintes da partícula contribuem mais com seu sinal óptico não-linear. Foram avaliadas as contribuições dos antioxidantes e dos fosfolipídios. Esses componentes foram escolhidos com base em trabalhos anteriores do grupo [16].

Antioxidantes

Para avaliar a contribuição dos antioxidantes no sinal óptico não-linear das amostras

de LDL, foi extraída a totalidade de antioxidantes de metade de uma amostra de LDL nativa. A outra metade foi mantida intacta. Foram realizadas medidas de ZS, nas mesmas condições experimentais, dos antioxidantes extraídos e da amostra intacta. Na figura 2.9 é possível observar que os antioxidantes isolados em solução (pontos em azul) apresentam quase a mesma amplitude pico-vale que a amostra de LDL (pontos em vermelho), dando a ideia de que os antioxidantes têm papel relevante no sinal óptico não-linear da LDL.

Figura 2.9: Comparação entre o sinal óptico não-linear de uma amostra de LDL total (em vermelho) e dos antioxidantes isolados da mesma amostra (em azul).

Fosfolípidos, Colesterol e Triglicéride

Também foram avaliadas as contribuições dos fosfolípidios, do colesterol e dos triglicérides no sinal óptico não-linear das amostras de LDL. Para realizar esta avaliação foram utilizadas amostras de LDE. Essas partículas, que mimetizam a LDL, são sintetizadas pelo Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (InCor) do

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. A camada externa da LDE é formada por fosfatidilcolina (um dos principais fosfolipídios que compõem a camada externa da LDL) e colesterol livre. Já seu interior é composto por ésteres de colesterol e triglicérides [39]. As principais diferenças entre as partículas de LDE e de LDL são a ausência da ApoB-100, dos antioxidantes e de alguns fosfolipídios na estrutura da LDE.

As medidas de ZS mostraram que a LDE não apresenta sinal óptico não-linear em 532 nm, como pode ser observado na figura 2.10.

Figura 2.10: Resposta óptica não-linear da LDE medida em arranjo de ZS, com luz de 532 nm, para diferentes potências incidentes.

Há trabalhos anteriores que estudaram o sinal óptico não-linear de componentes da LDL [16]. A partícula foi separada em três grupos de constituintes: a) ácidos graxos, b) lipídios neutros e c) fosfolipídios. A amostra composta pelos fosfolipídios foi a que apresentou a maior intensidade no sinal óptico não-linear. É possível que esse sinal venha da contribuição dos antioxidantes, cuja presença não foi especificada nas amostras estudadas anteriormente.

Lipoproteínas de alta densidade

A figura 2.11 apresenta algumas curvas da dependência espacial obtidas nas medidas de HDL. Além da curva da naHDL, são apresentadas, para comparação, as curvas da amostra de HDL oxidada por 30 minutos e a oxidada por 18 horas. Os ajustes apresentados foram obtidos pelo método iterativo, utilizando a equação 2.5. Um resultado interessante é o fato de, mesmo após 18 horas de oxidação, a amostra HDL ainda apresentar sinal de transmitância óptica não-linear, indicando que há diferenças importantes na oxidação da LDL e da HDL.

Figura 2.11: Curvas médias da dependência espacial da transmitância normalizada das amostras naHDL, oxHDL-30min e oxHDL-18h. As linhas contínuas são os ajustes iterativos obtidos com a equação 2.2.

Na figura 2.12 é possível observar os valores de θ obtidos nos ajustes realizados com a equação 2.2 em função do tempo de oxidação das amostras. Diferentemente do resultado apresentado para as amostras de LDL, os valores de θ das amostras de HDL não foram normalizados pela potência incidente na amostra, pois todas elas foram medidas com a

mesma potência.

Figura 2.12: Valores de θ obtidos nos ajustes das curvas de ZS das amostras de HDL nativa e oxidadas através da equação 2.2.

2.4.2 Absorção linear

Lipoproteínas de baixa densidade

As figuras 2.13 e 2.14 mostram dois gráficos típicos obtidos nas medidas de absorção linear. No gráfico da figura 2.13 é possível comparar o espectro da LDL nativa (curva rosa) com os espectros das soluções de LDE. Na região entre 400 e 550 nm a LDL apresenta alguns picos que não aparecem nos espectros da LDE. A linha vertical azul marca o comprimento de onda de 532 nm, que é o λ da luz emitida pelo laser utilizado nas medidas de ZS.

Figura 2.13: Espectro de absorção linear de amostras com soluções contendo LDE em diversas concentrações. A linha vertical azul marca $\lambda = 532 \text{ nm}$, que é o comprimento de onda usado nos experimentos de ZS.

Figura 2.14: Espectro de absorção linear de soluções contendo LDL em função do tempo de oxidação *in vitro*. A linha vertical azul marca $\lambda = 532 \text{ nm}$, que é o comprimento de onda usado nos experimentos de ZS.

Na figura 2.14 vemos como a intensidade da luz absorvida na região entre 400 e 550 nm diminui em função do tempo de oxidação das amostras. A absorvância do PBS foi medida para verificar que a solução de fundo não absorve luz na região de interesse ($\lambda = 532$ nm). Novamente, o comprimento de onda utilizado nas medidas de ZS é marcado por uma linha vertical azul.

A partir dos espectros de absorção linear da LDL com diferentes graus de oxidação foi construído um gráfico de α (532 nm) em função do tempo de oxidação *in vitro* das amostras (figura 2.15). O coeficiente de absorção linear diminui com a oxidação das amostras. Macroscopicamente é possível perceber uma mudança na coloração das amostras: a naLDL apresenta um aspecto amarelado, o qual tende a desaparecer em função do processo de oxidação; as amostras mais oxidadas são praticamente transparentes.

Figura 2.15: Coeficiente de absorção linear em 532 nm em função do tempo de oxidação *in vitro* das amostras de LDL. As incertezas apresentadas estão relacionadas apenas à dispersão nas medidas, não levando em conta outras fontes de erro.

Lipoproteínas de alta densidade

A figura 2.16 apresenta os espectros de absorção linear das soluções de HDL. Assim como os espectros das amostras de LDL, eles contêm uma região de maior absorção entre 400 e 500 nm. Os espectros de absorção linear também apresentam similaridades com os das amostras de LDL quanto ao comportamento em relação à oxidação: os fótons com comprimento de onda entre 400 e 500 nm são menos absorvidos conforme a oxidação aumenta.

Figura 2.16: Espectro de absorção linear de soluções contendo HDL em função do tempo de oxidação *in vitro*. A linha vertical azul marca $\lambda = 532$ nm, que é o comprimento de onda usado nos experimentos de ZS.

Na figura 2.17 são apresentados os valores do coeficiente de absorção linear em 532 nm em função do tempo de oxidação. Podemos observar que há uma grande queda entre os tempos de oxidação de 5 e 30 minutos e em seguida uma queda menos intensa no coeficiente para uma variação de tempo de oxidação grande (entre 30 minutos e 18 horas).

Figura 2.17: Coeficiente de absorção linear em 532 nm em função do tempo de oxidação *in vitro* das amostras de HDL.

2.4.3 Calorimetria

A figura 2.18 apresenta um gráfico típico do ajuste linear realizado para determinar o coeficiente angular da reta obtida através da equação 2.10. Neste caso a reta ajustada foi $Pt(T) = (3,482 \pm 0,003)T - (1756,38 \pm 0,26)$, em mJ.

A figura 2.19 apresenta os valores médios de c_v encontrados em função do tempo de oxidação de cada amostra. A incerteza de cada ponto foi obtida através do cálculo do desvio padrão das três medidas de cada amostra. Apesar do desvio padrão de $n = 3$ ser subestimado, esse valor nos dá uma estimativa do erro do valor médio de c_v para cada amostra. O comportamento obtido é compatível com uma constante, isto é, praticamente não varia com a oxidação da amostra.

Figura 2.18: Gráfico típico de um ajuste linear dos dados obtidos nas medidas de calorimetria. A reta ajustada foi $Pt(T) = (3,482 \pm 0,003)T - (1756,38 \pm 0,26)$. As barras de erro experimental não aparecem por serem menores do que o tamanho dos pontos.

Figura 2.19: Gráfico com os valores médios de c_v em função do tempo de oxidação.

2.4.4 Coeficiente termo-óptico e densidade

A figura 2.20 apresenta um resultado típico obtido nas medidas de dn/dT . Pode-se observar que o índice de refração da solução de LDL variou linearmente com a temperatura. O coeficiente termo-óptico corresponde ao coeficiente angular da reta. Assim, para cada medida realizada foi obtido um valor de dn/dT . Os valores dos coeficientes angulares obtidos em cada uma das quatro medidas são apresentados na figura 2.21. Como não houve variação significativa entre os resultados da amostra de LDL nativa e da oxidada *in vitro* por 90 minutos, não foram realizadas medidas com amostras de níveis intermediários de oxidação.

Figura 2.20: Gráfico típico de um ajuste linear dos dados obtidos nas medidas de dn/dT . A reta ajustada foi $n(T) = (-1,29 \pm 0,11) \times 10^{-4}T + (1,3375 \pm 0,0004)$.

Figura 2.21: Valores de dn/dT obtidos através do ajuste linear das seguintes medidas realizadas: duas com LDL nativa e duas com LDL oxidada *in vitro* por 90 minutos.

Figura 2.22: Valores de densidade das soluções de LDL em função do tempo de oxidação.

A figura 2.22 apresenta os valores de densidade obtidos nas medidas das soluções de LDL em função do tempo de oxidação *in vitro*. É possível observar que não há variação significativa entre os valores encontrados.

2.4.5 Cromatografia líquida de alta performance

A figura 2.23 apresenta o consumo de tocoferóis e carotenóides durante o processo de oxidação. É possível observar a diminuição do conteúdo de antioxidantes das amostras com o aumento do tempo de oxidação. Lembrando que a fase de propagação da oxidação inicia-se com o consumo quase total dos antioxidantes presentes na LDL (figura 1.3), podemos estimar que, para estas amostras, o fim da fase de iniciação e início da fase de propagação se dá entre 40 e 50 minutos do nosso processo de oxidação.

Figura 2.23: Consumo do conteúdo de antioxidantes das LDLs em função do tempo de oxidação das amostras.

Já a figura 2.24 apresenta o aumento na concentração dos produtos de oxidação nas amostras em função de seus tempos de oxidação. Tanto os hidroperóxidos de colesterol, quantos os de fosfolipídios aparecem em quantidades aproximadamente contantes, até por volta do tempo de oxidação de 40 minutos. Após esse tempo de oxidação, a produção de hidroperóxidos passa a aumentar. Este resultado reforça a afirmação anterior de que o final da fase de iniciação do processo de oxidação ocorre, para estas amostras, por volta de 40 minutos (de oxidação *in vitro*) nas condições descritas na seção 2.3.2.

Figura 2.24: Produção de hidroperóxidos de colesterol e de fosfolipídios em função do tempo de oxidação das amostras.

É importante deixar claro que as quantificações apresentadas são relativas. No caso dos antioxidantes foi definido que a LDL nativa (tempo 0 de oxidação) conserva 100% do teor antioxidante das amostras. Isto é, a área relativa aos picos dos tocoferóis foi contabilizada e o valor obtido foi definido como 100%. Para as amostras com tempos de

oxidação subsequentes o valor da área do pico foi dividido pelo valor obtido com a amostra de naLDL. O mesmo procedimento foi utilizado para determinar a quantificação relativa dos carotenóides. No caso da produção de hidroperóxidos, tanto de fosfolipídios quanto de colesterol, o valor obtido na quantificação da área do pico da amostra oxidada por 90 minutos foi definido como 100%.

2.4.6 Difusividade térmica

Os resultados apresentados nas seções 2.4.3 e 2.4.4 mostram que o calor específico, o coeficiente termo-óptico e a densidade das amostras de LDL não variam significativamente devido à oxidação. Desta forma podemos calcular o valor médio para cada uma dessas grandezas. A tabela 2.3 apresenta os valores médios obtidos e seus respectivos desvios padrão. Na mesma tabela apresentamos, para fins de comparação, os valores obtidos em medidas de água mili-Q. Todos os valores médios obtidos para as amostras de LDL são comparáveis aos valores obtidos nas medidas de água.

Tabela 2.3: Tabela com os valores médios de c_v , ρ e $-dn/dT$ calculados a partir das medidas de LDL em função do tempo de oxidação. O valor da densidade da água é um valor de referência a $20^\circ C$ e foi obtido através de [40].

	LDL	água
$c_v \left(\frac{J}{g \cdot K} \right)$	3.73 (24)	4,19 (5)
$\rho \left(\frac{g}{cm^3} \right)$	1,006 (10)	0,99821
$-\frac{dn}{dT} (mK^{-1})$	0,134(8)	0,121 (8)

O gráfico da figura 2.15 indica que a absorção linear das amostras em 532 nm diminui com o aumento da oxidação. Se a absorção linear fosse o único parâmetro físico, característico da amostra, responsável pela variação de θ (equação 2.4), θ/PA deveria ser uma constante independente do tempo de oxidação. A figura 2.25 expõe θ/PA como uma função do tempo de oxidação para todas as amostras de LDL oxidadas *in vitro*.

Figura 2.25: Parâmetro θ (ajustado pela equação 2.2), normalizado pela potência (P) incidente do laser e pela absorvância decádica (A), em função do tempo de oxidação de cada amostra.

É evidente que θ/PA tem um comportamento decrescente em função do grau de oxidação das amostras, o que indica, conforme a equação 2.4, que a difusividade térmica delas deve variar com a oxidação, já que c_v , ρ e dn/dT são constantes.

A partir dos dados obtidos no experimento de espectrofotometria (figura 2.15) e dos valores médios de c_v , ρ e dn/dT da tabela 2.3, é possível realizar o ajuste iterativo da equação 2.5 aos dados experimentais das medidas de ZS com as amostras de LDL oxidada *in vitro* com $CuSO_4$, para diferentes intervalos de tempo (de 0 até 90 minutos), e obter a difusividade térmica (D) das amostras em função do tempo de oxidação. Lembrando que neste procedimento de ajuste, além da curva de ZS com dependência espacial são ajustadas várias curvas com dependência temporal e o valor final do ajuste é aquele que melhor ajusta todo o conjunto de curvas. Ajustes típicos podem ser observados nas figuras 2.6a e 2.6b.

O comportamento obtido para a difusividade térmica das amostras de LDL é apresen-

tado na figura 2.26, porém apenas até o tempo de oxidação de 70 minutos. As amostras oxidadas por 80 e 90 minutos tiveram valores baixos de absorção linear e de transmitância não-linear. Na curva de dependência espacial da transmitância normalizada destas amostras não é possível separar o sinal do fundo, e, por esta razão, os valores de difusividade obtidos para estas amostras não são confiáveis (apresentando erros superiores ao seu valor) e não são apresentados na figura 2.26.

Figura 2.26: Valores de D obtidos através do ajuste da equação 2.5 aos dados de ZS, em função do tempo de oxidação.

2.5 Sumário dos resultados de caracterização óptica das lipoproteínas

Através dos resultados de α , ρ , c_p e dn/dT e do modelo de LT, é possível inferir que a difusividade térmica das amostras altera-se em função da oxidação *in vitro*. Os resultados

de difusividade térmica obtidos apresentam um comportamento crescente de D em função do tempo de oxidação, isto é, quanto mais oxidada a amostra mais eficientemente o calor absorvido se dissipa através do meio. Comparando estes resultados (figura 2.26) com os resultados das medidas de hidroperóxidos (figura 2.24), é possível observar um comportamento similar: um pequeno crescimento até cerca de 40 minutos de oxidação e após esse tempo um aumento mais pronunciado. Essa semelhança no comportamento sugere uma correlação importante entre a produção de hidroperóxidos (PLOOH e ChOOH) e a difusividade térmica das amostras.

Os hidroperóxidos são moléculas pequenas, com mais mobilidade do que as partículas de LDL. Essas moléculas são capazes de migrar de uma LDL para outra e, deste modo, propagar o calor e o processo oxidativo através do meio [41]. Este processo de troca de produtos de oxidação entre as partículas aumenta a difusão de calor em toda a amostra. Espera-se que a troca de ChOOH e PLOOH entre LDLs aumente com o tempo de oxidação, visto que há mais produtos de oxidação disponíveis na solução. Como consequência dessa troca de produtos de oxidação entre diferentes partículas de LDL, é esperado um aumento da difusividade térmica da amostra, o que faz com que a lente térmica não se forme conforme o tempo de oxidação é aumentado.

Uma outra comparação interessante é a do consumo de carotenóides com o sinal da absorção linear das amostras (figura 2.27). A quantidade relativa de carotenóides cai a praticamente zero após 90 minutos de oxidação, enquanto a absorção linear cai pela metade neste mesmo tempo. O consumo dos carotenóides é o responsável por parte desta queda na absorção linear das amostras.

A partir dos resultados obtidos é possível formular a hipótese de que o sinal de ZS das amostras de LDL depende de dois fatores: a necessidade de que a amostra absorva energia em 532 nm, que, pelo menos em parte, está ligada à quantidade de antioxidantes da amostra; e a quantidade de produtos de oxidação presente na amostra. Assim, o aquecimento da amostra acontece devido ao conteúdo de antioxidantes das partículas e a

velocidade de homogeneização do calor muda em função da quantidade de produtos de oxidação presentes. Esses são os parâmetros que definem se haverá, ou não, a formação da lente térmica.

Figura 2.27: Comparação entre o consumo relativo de carotenóides e a diminuição relativa no sinal de absorção linear das amostras de LDL em função do tempo de oxidação.

Por último, é interessante comparar os resultados de ZS obtidos para as HDLs com os obtidos para as LDLs. Pelo fato de todas as lipoproteínas terem uma estrutura parecida, é possível que o mecanismo de formação da lente térmica seja o mesmo. Porém as amostras de HDL apresentaram uma diminuição do parâmetro θ bastante diferente daquela observada para as amostras de LDL, em função do tempo de oxidação. Enquanto a LDL perde o sinal por completo com menos de duas horas de oxidação *in vitro*, a HDL resiste por mais de 18 horas. É importante ter cuidado ao comparar os resultados de LDL e HDL pois

as amostras têm concentrações diferentes. Ao mesmo tempo é pouco provável que este resultado possa ser explicado por uma maior concentração de HDL nas amostras.

Dentro desta perspectiva, o fato da HDL apresentar sinal de ZS após 18 horas de oxidação é um resultado bastante interessante e que poderia ser complementado com medidas de HPLC com o objetivo de quantificar tanto a formação de produtos de oxidação, quanto o consumo de antioxidantes. Uma abordagem enriquecedora seria a comparação da quantidade e do consumo dos antioxidantes das amostras de LDL e HDL de um mesmo indivíduo. É importante lembrar que a principal dificuldade de se trabalhar com as HDLs é a impossibilidade de quantificar a concentração das amostras em termos de número de partículas por unidade de volume. Esta particularidade torna inadequada a comparação de resultados obtidos com amostras obtidas em separações de HDL independentes, porém o GFCx-IFUSP tem trabalhado neste sentido.

3

Caracterização estrutural das lipoproteínas

A caracterização estrutural das lipoproteínas foi feita através das técnicas de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). A técnica SAXS é comumente utilizada no estudo da forma e da estrutura de sistemas nanométricos em solução [42]. Ela pode ser empregada na investigação de estruturas com dimensões que variam entre 1 nm e 1 μ m, fornecendo informações sobre o tamanho, a forma, a polidispersão, a flexibilidade e o estado de agregação dos objetos que compõem a amostra [43]. Assim, essa técnica é apropriada para a análise de proteínas, sistemas micelares, polímeros, etc. Já a técnica de DLS é utilizada principalmente na análise da presença e evolução de agregados. Nesta tese a técnica de DLS teve um papel complementar e seus resultados

foram empregados apenas para corroborar alguns dos resultados obtidos com a técnica SAXS.

A aplicação da técnica SAXS no estudo da estrutura de lipoproteínas ocorreu pela primeira vez no início da década de 1970. Os primeiros trabalhos relacionados a partículas de HDL já apontavam para objetos esféricos com diâmetro médio de 9,6 nm [44]. Além disso, foram apresentadas as primeiras curvas do perfil de densidade eletrônica de amostras de LDL e de HDL, porém os modelos utilizados ainda eram muito rudimentares e só eram capazes de fornecer uma ideia geral sobre a estrutura interna das partículas. No caso de LDLs, os resultados também apontavam para partículas esféricas, porém com diâmetro em torno de 24 nm, e para uma possível organização lamelar do colesterol contido na região interna da partícula [45, 46]. Desde então, os métodos para analisar os resultados obtidos com a técnica SAXS evoluíram significativamente, porém mesmo os mais recentes, publicados na década de 1990, não obtiveram grandes melhorias nos ajustes das curvas aos dados experimentais de intensidade de espalhamento de raios X de partículas complexas como as lipoproteínas do tipo LDL e HDL. Apesar das limitações, houve alguns avanços na compreensão estrutural das lipoproteínas. A oxidação *in vitro* das partículas de LDL foi estudada anteriormente ao desenvolvimento desta tese e os resultados de SAXS apontaram não haver grandes mudanças estruturais nas partículas para amostras oxidadas por menos de 25 horas com cobre [47]. Nos últimos 30 anos o conhecimento sobre a estrutura das lipoproteínas avançou consideravelmente, porém muitas dúvidas sobre o empacotamento do colesterol na região interna das partículas de LDL e sobre a orientação conformacional das apolipoproteínas ainda permanecem [48–50]. Neste sentido a técnica de crio-microscopia tem obtido bons resultados. Os estudos apontam para a organização lamelar do colesterol na região interna das partículas de LDL e para o papel determinante dos triglicerídios na temperatura na qual ocorre a transição desta fase lamelar para uma fase desorganizada [51].

Esta tese utiliza uma nova abordagem, que foi originalmente desenvolvida por Oliveira e colaboradores, para ajustar as curvas experimentais de intensidade de espalhamento e

obter o perfil de densidade eletrônica de sistemas lamelares ou com simetria cilíndrica [52]. Através da colaboração com o prof. Cristiano Oliveira, membro do GFCx-IFUSP, foram realizadas adaptações nos modelos para sistemas com simetria esférica, possibilitando sua aplicação aos dados de LDL e HDL. Os resultados obtidos nos ajustes das curvas experimentais de espalhamento são sensivelmente melhores do que aqueles apresentados na literatura [45–47], produzindo curvas de perfil de densidade eletrônica mais precisas.

3.1 A técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos

Na técnica SAXS a amostra é iluminada com um feixe de raios X e cada elétron da amostra se torna um novo centro espalhador. A figura 3.1 traz o desenho esquemático de um arranjo típico. Os centros espalhadores estão arbitrariamente posicionados com distâncias diferentes entre si. A interação dos raios X com a amostra tem origem eletromagnética, e dá-se através das nuvens eletrônicas dos átomos que a compõem. Assim, os raios X espalhados carregam informações sobre o perfil de densidade eletrônica da amostra estudada.

Figura 3.1: Desenho esquemático do arranjo de espalhamento de raios X.

A figura 3.2 apresenta uma ampliação do esquema do espalhamento da figura 3.1. O fóton incidente, com vetor de onda $\vec{\kappa}_o$, interage com a amostra e é espalhado. Considerando

Figura 3.2: Relação entre o feixe incidente, o feixe espalhado e o vetor de espalhamento ($\vec{q}$).

que ocorre um espalhamento elástico, a onda espalhada (com vetor de onda $\vec{\kappa}_1$) tem o mesmo módulo do vetor de onda da onda incidente (com vetor de onda $\vec{\kappa}_0$). Desta forma, o vetor de espalhamento é escrito como:

$$\vec{q} = \vec{\kappa}_1 - \vec{\kappa}_0, \quad (3.1)$$

onde $|\vec{\kappa}_1| = |\vec{\kappa}_0|$. O módulo de $\vec{q}$ pode ser escrito como:

$$q = 2\kappa \sin \theta. \quad (3.2)$$

Lembrando que $\kappa = 2\pi/\lambda$, temos que

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta. \quad (3.3)$$

A relação entre o módulo do vetor $\vec{q}$ (figura 3.2) e a distância característica de difração d pode ser escrita como:

$$q = \frac{2\pi}{d}. \quad (3.4)$$

Em um arranjo típico de SAXS temos que $2\theta_{max} = 5^\circ$ para $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$. Nesse caso temos $q \approx 0,36 \text{ \AA}^{-1}$. Utilizando a equação 3.4, temos que a resolução mínima do arranjo é

de $\approx 18 \text{ \AA}$. Isto é, um arranjo nesta configuração não é capaz de medir objetos menores do que algumas dezenas de angstroms.

Em um sistema centro simétrico, a intensidade de espalhamento pode ser escrita como:

$$I(q) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (3.5)$$

onde $p(r)$ é a função distribuição de distância entre pares (PDDF) e r é a distância entre o centro da partícula e o ponto onde se calcula a função $p(r)$, definia da equação 3.6.

Tomando a transformada de Fourier inversa da equação 3.5 temos

$$p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\sin(qr)}{qr} dq \quad (3.6)$$

A função de espalhamento $I(q)$ está no espaço recíproco e a função $p(r)$ está no espaço real. Quando estruturas tridimensionais são representadas por uma função unidimensional, que relaciona a intensidade espalhada com o ângulo de espalhamento, há uma perda de informação que é impossível de ser completamente recuperada. A figura 3.3 mostra a relação entre a função de intensidade de espalhamento e a função de distribuição de pares de distância.

Figura 3.3: Figura esquemática da relação entre a função de espalhamento, $I(q)$, e a função distribuição de distância entre pares.

A distribuição $p(r)$ pode ser interpretada como sendo um histograma de distâncias internas à partícula. Ela é subdividida em diversos pequenos elementos de volumes idênticos (pequenos se comparados com a flutuação local de densidade eletrônica). Cada ponto no eixo das abscissas da função $p(r)$ representa a distância r entre dois elementos de volume i e j . Os valores de $p(r)$ representam a quantidade de segmentos com tamanho r que cabem dentro do volume de uma partícula, com peso dado pelo tamanho do segmento. Se escolhermos $r = 0$ o segmento não ligará o elemento de volume i a nenhum outro elemento de volume j e a função vai para zero. Para valores de $r > D$, onde D é a dimensão máxima da partícula, $p(r)$ também será zero. A figura 3.4 mostra um desenho esquemático da $p(r)$ e sua relação com os tamanhos de segmentos dentro da partícula.

Figura 3.4: Figura esquemática da distribuição $p(r)$. Neste exemplo, a amplitude da função para o valor de $r = 25$ (unidades arbitrárias) é proporcional à quantidade de segmentos de tamanho 25 (unidades arbitrárias) que cabem na partícula de tamanho 75 (unidades arbitrárias).

No estudo de partículas multilamelares os segmentos podem ficar com as extremidades em regiões com diferentes densidade eletrônica (segmentos representados em vermelho na figura 3.4). Por exemplo, com relação às partículas de LDL, haverá certamente segmentos que estarão com uma extremidade no núcleo hidrofóbico e a outra na monocamada de

fosfolipídios. Dessa forma, a densidade eletrônica em cada extremidade do segmento será diferente. O produto dessa diferença deve ser incorporado à PDDF. Desta forma, quando trata-se de partículas multilamelares, cada segmento r deve ser também pesado pelo produto da diferença da distribuição eletrônica de cada extremidade do segmento. Assim, é possível que, além de contribuições positivas, sejam obtidas contribuições negativas à PDDF. Deste modo, um ponto de mínimo no espaço real pode ser causado pelo baixo número de contagens no canal do histograma ou pela adição de contribuições positivas e negativas.

A análise dos dados experimentais dá-se solucionando o problema inverso do espalhamento, isto é, deve-se estimar a forma da partícula que dá origem a uma determinada curva de espalhamento. Este problema não possui solução única. A simulação de curvas de espalhamento a partir da forma das partículas fornece informações sobre as possíveis curvas de espalhamento que devem ser esperadas. Estas simulações são o ponto inicial das análises de SAXS.

Já no caso de partículas monodispersas, é possível determinar o tamanho, a forma e, em certas condições, a estrutura interna das partículas. No caso de sistemas polidispersos é possível determinar a distribuição de tamanhos das partículas que o compõem.

Os modelos utilizados na interpretação dos dados de SAXS pressupõem sistemas muito diluídos, nos quais as distâncias entre as partículas são muito maiores que seus diâmetros. De forma geral o volume das partículas estudadas representa, aproximadamente, menos de 1% do volume total da amostra.

No estudo de partículas multilamelares (caso das lipoproteínas) é necessário utilizar informações obtidas *a priori* para obter uma reconstrução da distribuição $p(r)$ unívoca capaz de descrever os dados de espalhamento obtidos nas medidas de SAXS.

3.2 Estratégia para a análise de dados

A primeira etapa da análise dos dados experimentais consistiu na aplicação do método da transformada de Fourier inversa, através do qual foi verificado se havia, ou não, aglomerados de partículas nas amostras. No caso das amostras de LDL, os aglomerados foram observados e por isso foi necessário utilizar o método de generalização da transformada de Fourier inversa com o objetivo de desacoplar o fator de forma, que está relacionado às partículas, do fator de estrutura, relacionado aos aglomerados. Já no caso das HDLs não foram observados agregados e esta etapa não foi necessária. Por último foi realizada uma metodologia de deconvolução quadrática do fator de forma com o objetivo de determinar o perfil de densidade eletrônica médio dos monômeros que compunham as amostras tanto de LDL quanto de HDL.

3.2.1 Método da transformada de Fourier inversa

O método da transformada de Fourier inversa (IFT) foi utilizado na análise das curvas de intensidade de espalhamento de raios X sem o desacoplamento entre o fator de forma e o fator de estrutura. Assim, a função $p(r)$ obtida para as amostras de LDLs contém informações tanto dos monômeros quanto dos agregados presentes nas soluções. Já no caso das lipoproteínas do tipo HDL, no qual não foram observados aglomerados, os ajustes obtidos com o método IFT são compostos apenas pelo fator de forma das partículas. Como as distribuições $p(r)$ são obtidas a partir dos ajustes, elas só possuem informações sobre os monômeros de HDL.

Na modelagem foi utilizado o programa *WIFT* [53], com o qual se obtém uma curva teórica, que se ajusta aos dados, e a correspondente função $p(r)$. Lembramos que a intensidade de espalhamento experimental ($I(q)$) e a função distribuição de distância entre pares estão ligadas por uma transformada de Fourier, como mostrado nas equações 3.5 e 3.6.

A partir dos resultados obtidos através do método IFT foi possível estimar o raio de giro (R_g) das partículas, que pode ser escrito em função da distribuição $p(r)$ como [54]:

$$R_g^2 = \frac{\int_v p(r)r^2 dV}{\int_v 2p(r)dV}. \quad (3.7)$$

Dessa forma, é possível determinar o raio de giro médio das partículas estudadas a partir da função $p(r)$ dos dados experimentais de intensidade de espalhamento em função de q . Considerando que tenhamos partículas esféricas homogêneas, o raio médio pode ser obtido através de [55]:

$$R = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g. \quad (3.8)$$

É importante ter em mente que, como este método não desacopla o fator de forma do fator de estrutura, o raio de giro e, conseqüentemente, o raio médio obtidos têm contribuições dos monômeros e dos agregados existentes na amostra (caso das amostras de LDL).

3.2.2 Método de generalização da transformada de Fourier inversa

A análise inicial com o método IFT forneceu informações relevantes sobre os monômeros de LDL e os correspondentes agregados formados, porém para uma melhor compreensão do sistema é necessário desacoplar as informações do fator de forma e do fator de estrutura. Uma forma usual de se fazer isso é utilizar a aproximação de desacoplamento da intensidade de espalhamento [56]:

$$I(q) = P(q)S(q). \quad (3.9)$$

Existem várias alternativas para descrever a intensidade dessa forma e com isso obter os fatores de forma e de estrutura do sistema. Uma possibilidade é o método de generalização

da transformada de Fourier inversa (GIFT) [53, 57]. Nesse método, o fator de forma é descrito pela transformada de Fourier de uma função $p(r)$ (como no método de IFT), mas funções analíticas ou semi-analíticas são incluídas no cálculo para descrever o fator de estrutura. Nesse caso, todos os coeficientes, tanto do fator de forma quanto do fator de estrutura, são otimizados simultaneamente. Uma forma de realizar este desacoplamento é escrever $I(q)$ como:

$$I(q) = \kappa P(q)(1 + \beta(q)[S(q) - 1]),$$

onde κ é uma constante de proporcionalidade (para medidas em escala absoluta, $\kappa = N\Delta\rho^2V^2$, sendo N o número de elétrons e $\Delta\rho$ o contraste de densidade eletrônica da partícula de volume V); $P(q) = I_1(q) = \langle f^2(\vec{q}) \rangle$ é o fator de forma da partícula, $\beta(q) = \langle f(\vec{q}) \rangle^2 / \langle f^2(\vec{q}) \rangle$ sendo que $\langle f(\vec{q}) \rangle$ é a média da amplitude de espalhamento em todas as orientações; e $S(q)$, o fator de estrutura médio do sistema. Aproximações para o termo $\beta(q)$ podem ser obtidas através do ajuste de parte da curva por um modelo de um elipsoide de revolução ou cilindro [53]. O fator de forma é calculado usando a expressão

$$P(q) = 4\pi \int_0^{D_{max}} p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr,$$

que é similar ao indicado na equação 3.6, porém aqui o fato de a partícula possuir uma dimensão máxima finita (D_{max}) é explicitado na integral.

O fator de forma contém informações sobre a forma dos monômeros de lipoproteínas. Como descrito anteriormente ele é obtido pela transformada de Fourier da PDDF. Já o fator de estrutura descreve como estas partículas estão aglomeradas. Existem na literatura diversas expressões que podem ser usadas para modelar $S(q)$. Nas análises apresentadas neste trabalho para as amostras de LDL diversas tentativas de modelagem foram utilizadas. Ao final, o fator de estrutura do sistema foi melhor descrito como arranjos fractais, tanto para a amostra de naLDL quanto para as amostras de oxLDL. O fator de estrutura para

um sistema formado por agregados fractais é dado por [58]:

$$S_{frac}(q) = 1 + \frac{1}{(qR)^D} \frac{D\Gamma(D-1)}{[1 + 1/(q^2\zeta^2)]^{(D-1)/2}} \sin[(D-1) \tan^{-1}(q\zeta)], \quad (3.10)$$

onde D é a dimensão fractal, Γ é a função gama, R é o raio típico das subunidades e ζ o tamanho do agregado fractal.

Ao ajustar o fator de forma das partículas aos resultados experimentais, utilizando o método GIFT, obtemos a intensidade de espalhamento dos monômeros para $q \rightarrow 0$ ($I_m(0)$). No caso de amostras compostas por monômeros e agregados, como as amostras de LDL, é possível utilizar a intensidade de espalhamento para $q \rightarrow 0$ obtida com as análises com o método IFT como uma estimativa da intensidade de espalhamento dos agregados em $q \rightarrow 0$ ($I_{ag}(0)$). De posse destas duas informações é possível estimar a fração de intensidade e de número de agregados e monômeros.

A fração de intensidade normalizada pode ser calculada como:

$$FI_{ag}(0) = \frac{I_{ag}(0)}{I_{ag}(0) + I_m(0)}, \quad (3.11)$$

$$FI_m(0) = 1 - FI_{ag}(0), \quad (3.12)$$

onde FI_{ag} é a fração de intensidade dos agregados e FI_m é a fração de intensidade dos monômeros. Lembrando que $I(0) \propto N\Delta\rho^2V^2$, a fração de número de agregados pode ser estimada:

$$FN = \frac{I_{ag}}{I_m} \times \left(\frac{V_m}{V_{ag}} \right)^2. \quad (3.13)$$

onde V_m é o volume médio dos monômeros e V_{ag} é o volume médio dos agregados. A fração de número normalizada fica então:

$$FN_{ag} = \frac{FN}{1 + FN}, \quad (3.14)$$

$$FN_m = 1 - FN_{ag}. \quad (3.15)$$

O cálculo destas frações nos oferece uma estimativa da evolução da quantidade de monômeros e agregados que compõem as amostras em função, por exemplo, do tempo de oxidação.

3.2.3 Análise do perfil de densidade eletrônica das amostras

A amplitude de espalhamento $f(\vec{q})$ é dada pela transformada de Fourier da densidade eletrônica do centro espalhador ($\rho(\vec{r})$):

$$f(\vec{q}) = \frac{1}{4\pi} \int_V \rho(\vec{r}) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r}.$$

Contudo $f(\vec{q})$ não é mensurável e só pode ser acessada através de sua relação com a intensidade de espalhamento:

$$I(\vec{q}) = |f(\vec{q})|^2 = f(\vec{q}) \cdot f(\vec{q})^*. \quad (3.16)$$

A partir da relação da equação 3.16 é possível escrever $I(\vec{q})$ em função de $\rho(\vec{r})$:

$$I(\vec{q}) = \int_V \int_V \rho(\vec{r}') \rho(\vec{r}' - \vec{r}) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{r}) d\vec{r} d\vec{r}'.$$

Pelo fato das lipoproteínas não estarem fixas, mas poderem assumir qualquer orientação na amostra, é necessário calcular médias da intensidade de espalhamento para suas possíveis orientações, o que possibilita relacionar a intensidade de espalhamento média para uma partícula com a transformada de Fourier de uma função $p(r)$, como mostrado na equação 3.6 [59].

As informações sobre a densidade eletrônica ($\rho(\vec{r})$) das amostras podem ser obtidas através do método de deconvolução quadrática. Essa análise baseia-se na ideia de que as partículas possuem uma forma definida (em geral planar, cilíndrica ou esférica) e, através

de métodos matemáticos, obtém-se o perfil de densidade eletrônica ($\rho(r)$) ao longo da direção de simetria [60]. Originalmente baseado na análise da função $p(r)$, o método da deconvolução quadrática foi reformulado para ser utilizado diretamente na curva de intensidade $I(q)$ [52]. A vantagem desse método está no fato da análise poder ser executada diretamente no espaço recíproco, dando mais flexibilidade à modelagem [61]. Para os dados de lipoproteínas foi necessário reformulá-lo para a utilização em partículas com simetria esférica. A figura 3.5 esquematiza o modelo de deconvolução quadrática para o caso de partículas tridimensionais como, por exemplo, LDLs e HDLs.

Figura 3.5: Desenho esquemático do modelo utilizado na descrição da densidade eletrônica das lipoproteínas. R_{max} é o raio máximo da partícula e ε é sua anisotropia. Assim, se $\varepsilon = 1$ a partícula é esférica, se $\varepsilon < 1$ temos um esferóide oblato e se $\varepsilon > 1$ a partícula tem forma de um esferóide prolato.

A intensidade de espalhamento teórica que é ajustada aos resultados experimentais é dada por:

$$I(q) = S_{c1} P_{MOD}(q) + S_{c2} P_{Deb}(q) + Back, \quad (3.17)$$

onde $P_{MOD}(q)$ é o fator de forma obtido pelo arranjo concêntrico de cascas esféricas, S_{c_1} e S_{c_2} são fatores de escala e $Back$ é uma constante de fundo. $P_{Deb}(q)$, que pode ser interpretado como sendo o parâmetro para o qual se obtém o raio de giro das cadeias flexíveis, pode ser utilizado para descrever a quebra de simetria imposta nas camadas mais externas devido, por exemplo, à presença de proteínas. $P_{Deb}(q)$ pode ser escrito como [62]:

$$P_{Deb}(q) = 2 \frac{\exp(-R_g^2 q^2) + R_g^2 q^2 - 1}{(R_g^2 q^2)^2},$$

onde R_g é o raio de giro médio associado às cadeias flexíveis.

Para o fator de forma $P_{MOD}(q)$ é considerada uma polidispersão com largura σ no tamanho, bem como a possibilidade da partícula ter uma anisotropia ε . A polidispersão é introduzida utilizando a expressão:

$$P_{MOD}(q) = \frac{\int_0^\infty D(r) P_{mon}(q, r) dr}{\int_0^\infty D(r) dr},$$

onde $D(r)$ é uma distribuição de número (função de Shulz-Zimm com largura σ), $V(r)$ é o volume de uma partícula com raio R . O fator de forma $P_{mon}(q, r)$ é calculado usando a expressão 3.18, onde também é introduzida a anisotropia:

$$P_{mon}(q) = \int_0^{\pi/2} \left(F_M[q, r(R, \varepsilon, \alpha)] \exp \left[-\frac{1}{2} q^2 \sigma_{int} \right] \right)^2 \sin \alpha d\alpha, \quad (3.18)$$

onde $r(R, \varepsilon, \alpha) = R(\sin^2 \alpha + \varepsilon \cos^2 \alpha)^{1/2}$ e α é o ângulo entre a direção do segmento r e o eixo z do sistema de coordenadas esféricas. O termo Gaussiano com largura σ_{int} é utilizado para gerar uma suavização na interface entre as várias camadas esféricas e a função $F_M(q)$ é a amplitude de espalhamento das multicamadas esféricas, dada por [63]:

$$F_M(q) = \frac{1}{M_M} \left[\rho_1 V(R_1) F_S(q, R_1) + \sum_{i=2}^N (\rho_i - \rho_{i-1}) V(R_i) F_S(q, R_i) \right],$$

onde M_M é o volume de espalhamento da partícula dado por

$$M_M = \rho_1 V(R_1) + \sum_{i=2}^N (\rho_i - \rho_{i-1}) V(R_i),$$

e $F_S(q)$ é o fator de forma de uma esfera dado por

$$F_S(q) = \frac{3[\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3}.$$

Todos os parâmetros do modelo, bem como os fatores de escala, são otimizados utilizando um método de minimização por mínimos quadrados com vínculos [52].

Uma limitação do modelo é não ser capaz de ajustar a anisotropia e a polidispersão das partículas ao mesmo tempo. Isto é, um dos parâmetros deve ser fixo, para que o outro possa ser ajustado pelo programa. Dessa forma, ou a anisotropia ou a polidispersão deve ser uma informação obtida *a priori*.

Figura 3.6: Ajuste dos dados da amostra de LDL oxidada com cobre por 5 minutos explicitando as componentes dos ajustes do método GIFT e da deconvolução quadrática.

A figura 3.6 apresenta, como exemplo, as curvas obtidas através do método GIFT e do modelo de deconvolução quadrática para a amostra de LDL oxidada com cobre por 5 minutos. É possível observar as curvas do fator de forma ($\square$) e do fator de estrutura (curva em azul escuro) desacopladas através do método GIFT. Além disso, a figura apresenta a curva P_{Deb} (curva rosa) utilizada no ajuste do modelo de deconvolução quadrática (curva azul claro), com o objetivo de dar conta da assimetria causada pela ApoB-100 e a curva obtida do ajuste realizado com o parâmetro P_{Deb} fixo em zero (curva laranja), no qual os vales das oscilações são bem mais pronunciados.

3.3 Descrição experimental

3.3.1 Amostras

As amostras utilizadas nos estudos estruturais de LDL e HDL foram separadas e oxidadas conforme os métodos descritos nas seções 2.3.1 e 2.3.2, porém, no caso das LDLs, os tempos de oxidação foram outros, conforme apresentado na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Tabela esquemática das medidas de SAXS de lipoproteínas.

amostra	descrição
naLDL	LDL nativa
oxLDL-5min	LDL oxidada com cobre por 5 minutos
oxLDL-30min	LDL oxidada com cobre por 30 minutos
oxLDL-60min	LDL oxidada com cobre por 60 minutos
oxLDL-6h	LDL oxidada com cobre por 6 horas
oxLDL-18h	LDL oxidada com cobre por 18 horas
naHDL	HDL nativa
oxHDL-5min	HDL oxidada com cobre por 5 minutos
oxHDL-30min	HDL oxidada com cobre por 30 minutos
oxHDL-60min	HDL oxidada com cobre por 60 minutos
oxHDL-18h	HDL oxidada com cobre por 18 horas

Nos estudos relacionados à caracterização óptica todas as amostras de LDL tinham concentração de 1,0 mg de ApoB-100/mL de amostra. Já as amostras de oxLDL utilizadas

nos estudos de caracterização estrutural tinham concentração de 1,7 mg de ApoB-100/mL de amostra, e a naLDL tinha concentração de 2,8 mg de ApoB-100/mL de amostra. No caso das HDLs, todas as amostras apresentadas neste trabalho foram separadas em um único lote, assim, todas elas tinham a mesma concentração em partículas por unidade de volume.

3.3.2 Medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos

As medidas de SAXS de LDL apresentadas neste trabalho foram realizadas na linha SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) [64]. Um desenho esquemático do arranjo experimental pode ser observado na figura 3.7. Nele é possível identificar os principais componentes do arranjo.

O sistema de colimação do feixe é composto por três conjuntos de fendas de tântalo (componentes marcados com o número 1 na figura 3.7). Os dois primeiros conjuntos são responsáveis pela colimação do feixe. O terceiro conjunto tem a função de barrar o feixe espalhado nas fendas anteriores. O espelho (componente 2 da mesma figura) tem a função de colimar o feixe verticalmente. O cristal monocromador (componente 3) tem $250 \times 50 \times 1,5 \text{ mm}^3$. Ele está posicionado dentro de uma câmara de alto vácuo com pressão menor do que $5 \times 10^{-5} \text{ Pa}$. A separação entre a câmara do monocromador e o caminho até o espelho dá-se por uma janela de berílio com $125 \mu\text{m}$ de espessura. O porta-amostras (componente 4 da figura 3.7) é posicionado entre duas janelas de mica, cada uma com aproximadamente $25 \mu\text{m}$ de espessura e alinhado através de um transladador XY. O arranjo é composto por dois detectores unidimensionais sensíveis à posição (componente 5) que ficam posicionados no plano do foco da linha do feixe [64].

O porta-amostras, uma célula cilíndrica com dimensões internas de $1 \times 4 \times 8 \text{ mm}^3$, fica conectado a um banho térmico, tornando possível medidas com temperatura controlada. O sistema permite a troca da amostra sem degradação do vácuo no caminho do feixe [65].

Figura 3.7: Desenho esquemático do arranjo experimental da linha SAXS1 do LNLS. (1) sistema de colimação, (2) espelho para focalização vertical do feixe, (3) monocromador, (4) porta-amostras e (5) detectores. As medidas das dimensões são dadas em mm. Figura adaptada de [64].

As soluções são injetadas através de seringas manuais padrão. As medidas foram realizadas com as amostras a 22 °C e o volume utilizado variou entre 130 e 300 μL . Foi utilizado um feixe de fótons de $\lambda = 1,48 \text{ \AA}$. O intervalo em q variou entre 5×10^{-3} e $2,5 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, o que corresponde a aproximadamente $0,03 < \theta < 1,7$ graus e uma resolução que vai de 25 a 1250 $\text{\AA}$.

Já os resultados experimentais de SAXS das amostras de HDLs foram obtidos utilizando um equipamento Nanostar da *Bruker*, que fica no Laboratório de Cristalografia do IF-USP [66]. A figura 3.8 apresenta o desenho esquemático do arranjo experimental da linha do Nanostar. O arranjo é formado por uma fonte de raios X com radiação $\text{Cu-K}\alpha$ (1,54 $\text{\AA}$); um sistema de colimação vertical e horizontal, formado por um conjunto de espelhos (componente (2) da figura 3.8) e um conjunto de 3 fendas (componente (3) da figura 3.8); um porta-amostras com sistema computadorizado de deslocamento XY das amostras e um detector de fótons a gás bidimensional (componente (5) da figura

Figura 3.8: Desenho esquemático do arranjo experimental da linha do Nanostar localizada no Laboratório de Cristalografia do IF-USP. (1) fonte de raios X, (2) sistema de colimação, (3) sistema de fendas, (4) porta-amostras e (5) detector 2D.

3.8). Os porta-amostras utilizados são capilares de quartzo, que ficam conectados a um banho térmico que possibilita medidas com temperatura controlada. As medidas com a HDL foram realizadas com as amostras a 25 °C. O intervalo em q variou entre 9×10^{-3} e $3,5 \times 10^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, o que corresponde a aproximadamente $0,06 < \theta < 2,5$ graus e uma resolução entre 18 e 700 Å.

3.3.3 Espalhamento de luz dinâmico

As medidas de DLS de LDL foram realizadas no Instituto de Química da USP em colaboração com o Grupo de Pesquisa de Sistemas Biomiméticos. Foi utilizado um equipamento Zetasizer Nano ZS da *Malvern*. O arranjo era composto por um laser com comprimento de onda de 633 nm e um detector de fótons posicionado a 7° (coletando os fótons retroespalhados). As análises de dados foram realizadas com o próprio software de aquisição *Zetasizer*.

No caso das amostras de HDL as medidas foram realizadas no equipamento 90 Plus Particle Size Analyzer da *Brookhaven Instruments* do Grupo de Fluidos Complexos do IF-USP. Nesse aparelho de DLS é utilizado um laser com comprimento de onda de 657 nm e um detector posicionado a 90° em relação à direção do feixe incidente. Para analisar os dados foi utilizado o *Dynamic Light Scattering Software* da *Brookhaven Instruments*.

3.4 Resultados e análise de dados

3.4.1 Espalhamento de raios X a baixos ângulos

Lipoproteína de baixa densidade

Análise pelo método IFT

A figura 3.9 apresenta os resultados experimentais de espalhamento e os respectivos ajustes, obtidos com o método IFT (curvas laranja da figura 3.9), das amostras de LDL nativa (naLDL) e oxidadas com cobre (oxLDL). As curvas de SAXS obtidas com as amostras de LDL possuem vários máximos, o que já foi observado anteriormente por outros autores [45]. Esses máximos estão relacionados com a forma globular da partícula, bem como com a variação de densidade eletrônica em seu interior. A amplitude desses máximos altera-se com o grau de oxidação, o que pode indicar mudanças estruturais das lipoproteínas, bem como a formação de agregados.

Figura 3.9: Ajuste das funções aos resultados experimentais das amostras de LDL nativa e oxidadas *in vitro* com cobre por diferentes intervalos de tempo.

O máximo que aparece em $q = 0,17 \text{ \AA}^{-1}$ está relacionado a uma distância de repetição de aproximadamente $37 \text{ \AA}$. Essa distância está associada à ordenação, em lamelas, do interior lipídico da LDL [51]. As lamelas são formadas por duas moléculas de ester de colesterol ligadas. Esse máximo está presente em todas as amostras, mostrando que a organização lamelar do colesterol é preservada, ao menos em parte, durante o processo de oxidação. Porém na amostra oxLDL-18h o máximo é menos intenso, o que pode indicar alguma perda no ordenamento do colesterol.

Figura 3.10: Distribuição $p(r)$ obtida através do método IFT ajustado aos dados das amostras de oxLDL com diferentes graus de oxidação.

Através do IFT obtivemos a PDDF de cada amostra (figura 3.10). Similarmente às curvas de intensidade, as funções $p(r)$ também apresentam diversos máximos. Os monômeros de LDL podem possuir dimensão máxima próxima a $300 \text{ \AA}$. Portanto, informações presentes nas curvas $p(r)$ para valores maiores que esses devem corresponder à formação de agregados de LDL. É interessante notar que há um máximo em torno de $r = 420 \text{ \AA}$, melhor definido na amostra de naLDL. Este máximo deve corresponder à

distância média entre duas partículas de LDL. Para as amostras de oxLDL a curva $p(r)$ não apresenta um máximo definido em 420 Å, mas um prolongamento suave para valores maiores de r , o que pode indicar um maior número de oligômeros no sistema. Na região dos monômeros das funções $p(r)$ não é possível observar diferenças significativas nas curvas de oxLDL quando comparadas com a curva de naLDL. Esse resultado está de acordo com os resultados apresentados por Meyer e colaboradores [47], que só encontram diferenças significativas na intensidade de espalhamento em função de q , e nas distribuições $p(r)$, para amostras oxidadas por mais de 25 horas.

Figura 3.11: Raio médio obtido com o método IFT para as amostras de oxLDL.

Comparando a função $p(r)$ da amostra de LDL nativa com aquela da amostra oxidada por 18 horas, é possível observar um pequeno deslocamento do máximo localizado em torno de 210 Å, o qual está relacionado à distância de correlação próxima à superfície da partícula, variando aproximadamente 10 Å. Uma variação similar ocorre para o máximo localizado próximo a 420 Å, o qual se desloca para valores maiores. Há ainda uma pequena variação na intensidade dos outros máximos da função (lembrando que se optou por normalizar as

curvas de modo que os máximos localizados em torno de $210 \text{ \AA}$ tivessem a mesma altura). O deslocamento dos máximos indica um aumento do diâmetro da partícula, provavelmente induzido pela oxidação. Além disso, a variação da altura relativa dos máximos também indica alterações na estrutura interna da lipoproteína.

Considerando que a partícula de LDL é esférica, pode-se calcular o raio equivalente através do raio de giro médio obtido através do método IFT (equação 3.8). A figura 3.11 mostra que os valores de raio médio das partículas de LDL (nativas e oxidadas) variaram entre $220 \leq r \leq 250 \text{ \AA}$. Dado que não há evidências de um comportamento sistemático do raio médio das partículas em função do tempo de oxidação, tomamos como estimativa para a incerteza de cada valor o desvio padrão da amostra obtida.

Análise pelo método GIFT

Figura 3.12: Ajuste da curva de espalhamento inteira (curva em rosa) e do fator de forma (curva verde) aos resultados experimentais de $I(q)$ das amostras de LDL oxidadas *in vitro* com CuSO_4 .

Ao utilizarmos o método de generalização da transformada de Fourier inversa (GIFT) com fator de estrutura fractal, obtivemos os ajustes apresentados na figura 3.12. Os pontos

pretos representam os resultados experimentais, a curva verde representa o fator de forma das partículas e a curva rosa, o ajuste obtido com o método GIFT. É fácil observar que o desacoplamento entre o fator de forma e de estrutura ocorre principalmente a baixos ângulos, onde a curva do fator de forma não se ajusta bem aos resultados experimentais, mostrando que esta região é dominada por objetos maiores: os aglomerados de LDL, que são descritos pelo fator de estrutura.

A figura 3.13 apresenta as curvas de $p(r)$ obtidas através do ajuste com o método GIFT para as amostras de naLDL e oxLDL. Como esperado, estas curvas são muito parecidas na região de 0 a 300 Å (região do monômero) da figura 3.10. O máximo que ocorre por volta de 200 Å está, mais uma vez, deslocado para valores maiores na amostra oxLDL-18h, indicando possíveis mudanças no contraste de densidade eletrônica das partículas de LDL desta amostra. As curvas $p(r)$ das outras amostras não apresentam grandes variações quando comparadas com a distribuição $p(r)$ da naLDL.

Figura 3.13: Distribuições $p(r)$ obtidas através do ajuste com o método GIFT aos resultados experimentais das amostras de LDL nativa e oxidadas *in vitro* com CuSO_4 .

Na tabela 3.2 são apresentados os parâmetros de dimensão fractal e tamanho dos agregados obtidos nos ajustes com o método GIFT. A dimensão fractal (D_{frac}) é compatível com 3,0 em todos os ajustes, indicando que todas as amostras formam aglomerados fractais de volume. Já o parâmetro ζ pode ser interpretado grosseiramente como sendo o diâmetro médio dos aglomerados. Os resultados obtidos indicam que os agregados são formados por várias partículas (e não apenas por dois ou três monômeros). Os valores de ζ são maiores do que a resolução do arranjo (lembrando que o arranjo experimental utilizado no LNLS tinha resolução máxima de aproximadamente 1250 Å), devendo, portanto, ser interpretados apenas como indicativos. Além disso, a limitação na resolução é a responsável pelas incertezas percentualmente grandes dos valores de ζ mas, mesmo assim, é possível observar uma tendência de aumento do tamanho dos agregados com o aumento no tempo de oxidação das amostras.

Tabela 3.2: Parâmetros do ajuste do método de generalização da transformada de Fourier inversa obtidos para o grupo de amostras oxLDL.

Amostra	D_{frac}	$\zeta (\times 10^3 \text{ Å})$
naLDL	$3,072 \pm 0,026$	$2,2 \pm 0,6$
oxLDL-5min	$3,058 \pm 0,007$	$5,0 \pm 0,8$
oxLDL-30min	$3,007 \pm 0,009$	$3,9 \pm 0,7$
oxLDL-60min	$2,999 \pm 0,009$	$4,4 \pm 0,8$
oxLDL-6h	$3,011 \pm 0,007$	$8,4 \pm 2,2$
oxLDL-18h	$3,004 \pm 0,010$	11 ± 7

Com o fator de forma separado do fator de estrutura é possível avaliar o comportamento da evolução da formação de agregados de LDL em função do grau de oxidação das amostras. A figura 3.14a apresenta uma estimativa do raio dos aglomerados e monômeros em função do tempo de oxidação. Podemos observar que o raio médio dos monômeros e agregados parece não se alterar com o processo de oxidação, a não ser para a amostra oxLDL-18h, que apresenta uma estimativa do raio médio dos agregados ao menos 10% menor do que o das outras.

Figura 3.14: a) Evolução do raio dos agregados de LDL em função do tempo de oxidação da amostra. b) Evolução da contribuição média de monômeros e agregados para o sinal de intensidade de espalhamento em função do tempo de oxidação da amostra. c) Evolução da fração média do número de monômeros e agregados em função do tempo de oxidação da amostra. As incertezas dos ajustes são menores do que o tamanho dos pontos e por isso não aparecem.

A fração de intensidade do espalhamento revela o quanto agregados e monômeros contribuem percentualmente para o sinal de espalhamento das amostras. A figura 3.14b apresenta essas estimativas, calculadas em função do tempo de oxidação. As contribuições parecem não variar de forma significativa, apenas para a amostra oxidada por 18 horas há uma pequena queda da contribuição dos agregados e, conseqüentemente, um pequeno aumento da contribuição dos monômeros.

A figura 3.14c apresenta a estimativa da fração de número de agregados e monômeros, isto é, a porcentagem da amostra que era composta por monômeros e por agregados. Esses valores também não parecem variar para as amostras nativa e oxidadas, a não ser para a amostra oxLDL-18h, que tem um aumento da quantidade percentual de agregados. Este resultado é consistente com a literatura, corroborando a ideia de que LDLs oxidadas com Cu por 18 horas se agregam mais do que as partículas nativas [17].

Análise pelo método de deconvolução quadrática

O perfil de densidade eletrônica das partículas de oxLDL foi obtido através do método de deconvolução quadrática (subseção 3.2.3). Pelo procedimento de desacoplamento utilizado (método GIFT) foi possível obter o fator de forma do monômero, sem a influência do fator de estrutura. Este procedimento foi crucial para a correta interpretação dos dados.

O ajuste pelo método da deconvolução quadrática foi obtido fixando alguns parâmetros (equação 3.17). A anisotropia foi fixada em 0,9 pois há um consenso de que as partículas de LDL são levemente oblatas [67]. O raio de giro das cadeias flexíveis de aminoácidos (da ApoB-100) foi um parâmetro ajustado aos dados da amostra naLDL, com resultado de 54 ± 5 Å. Esse valor foi fixado nos demais ajustes (amostras de oxLDL). Em todas as curvas foram ajustados os seguintes parâmetros: raio médio, polidispersão, amplitudes de oscilação, constante de fundo e fatores de escala S_{c1} e S_{c2} (equação 3.17). A figura 3.15 mostra o ajuste do fator de forma para cada uma das amostras (nativa e oxidadas).

A figura 3.16 apresenta uma comparação do contraste de densidade eletrônica obtido

Figura 3.15: Ajustes do fator de forma obtidos com o método de deconvolução quadrática para as amostras de naLDL e oxLDL.

para as amostras naLDL e oxLDL em relação à densidade eletrônica da água (linha horizontal vermelha no gráfico da figura 3.16). É possível observar vários máximos e mínimos, indicando variações da densidade eletrônica na superfície e no interior das partículas. O significado de cada variação está relacionado à sua estrutura. Na camada mais externa é possível observar uma variação positiva-negativa entre aproximadamente 100 e 140 Å, o que corresponde ao comprimento aproximado da fosfatidilcolina, principal fosfolipídio que compõe a camada externa da LDL, medindo por volta de 42 Å. Nesta região de superfície também temos a presença da ApoB-100, o que pode alterar um pouco a altura desses máximos e mínimos, além de ser uma possível responsável pela variação negativa que ocorre para valores de raio maiores que 140 Å. Para valores menores que 100 Å de raio, tem-se outras variações no perfil, culminando com uma região bem definida (ordenada) no centro da partícula (região próxima de $x = 0$, no gráfico da figura 3.16). Essa grande variação no contraste de densidade eletrônica pode ser devida à organização

lamelar existente no interior das partículas de LDL, que está associada ao máximo de correlação existente nas curvas de espalhamento em $q = 0,17 \text{ \AA}^{-1}$. É interessante notar que a amostra oxLDL-18h tem o perfil de densidade eletrônica sensivelmente diferente das amostras menos oxidadas e da naLDL, o que era esperado a partir das curvas $p(r)$ obtidas (figuras 3.10 e 3.13). Esta diferença indica alterações, tanto na região central quanto na camada de fosfolípidios das partículas.

Figura 3.16: Perfil médio de densidade eletrônica das partículas de LDL em função da distância r ao centro da partícula, em relação à água.

Não houve evolução do raio médio das partículas em função do tempo de oxidação das amostras, como pode ser observado nas figuras 3.17a. Por outro lado, a dispersão do tamanho das partículas da amostra oxLDL-18h aumentou significativamente (figura 3.17b). Levando-se em conta que para todas as amostras a dispersão do raio é da ordem de $15 \text{ \AA}$, temos que os valores de raio obtidos são compatíveis com os apresentados na literatura [17, 51, 67].

Figura 3.17: a) Raio médio das partículas em função do tempo de oxidação. A reta representa a média dos seis pontos e vale 155,9 Å. b) Dispersão média do raio das partículas de LDL em função do tempo de oxidação. A reta representa a média da dispersão do raio e vale 14,25 Å.

Por outro lado, a figura 3.18 mostra que há uma mudança importante no fator de escala S_{c_2} (equação 3.17) para a amostra oxLDL-18h. Esse dado pode ser interpretado como um aumento da quantidade de cadeias flexíveis da ApoB-100 expostas na superfície das partículas de LDL, o que está de acordo com a ideia de que a oxidação ocorre preferencialmente nos sítios hidrofóbicos da LDL [68, 69]. Esses sítios, inicialmente imersos na região das cadeias carbônicas dos fosfolipídios, se expõem ao serem oxidados.

Figura 3.18: Evolução do fator de escala S_{c_2} (equação 3.17) em função do tempo de oxidação das amostras. Esse fator estaria associado à quantidade de cadeias flexíveis expostas da ApoB-100.

Lipoproteína de alta densidade

Análise pelo método IFT

As curvas de espalhamento das amostras de HDL nativa e oxidadas e os ajustes obtidos através do método IFT são apresentados na figura 3.19. As curvas obtidas com as amostras de HDL apresentam bem menos máximos do que as curvas obtidas com as amostras de

LDL, evidenciando as diferenças estruturais que existem entre os dois tipos de lipoproteínas. Além disso, não é possível observar variações significativas nas curvas de espalhamento devido à oxidação das amostras.

Figura 3.19: Ajuste, através do método IFT, aplicado aos resultados experimentais de SAXS das amostras de HDL nativa e oxidadas *in vitro* com cobre.

As curvas $p(r)$ apresentadas na figura 3.20 corroboram as interpretações das curvas de espalhamento. As distribuições $p(r)$ das amostras de HDL não apresentam vários máximos como as curvas obtidas com as amostras de LDL, indicando que as partículas de HDL parecem ter a estrutura (monocamada de fosfolipídio e núcleo hidrofóbico) menos complexa. Quanto às mudanças em função do tempo de oxidação das amostras, não é possível observar mudanças significativas. As distribuições $p(r)$ apresentam apenas uma pequena variação a partir de 35 Å, que pode estar associada a pequenas mudanças no perfil de densidade eletrônica das amostras, e pode ser melhor entendida com a análise da deconvolução quadrática. É possível observar ainda que as curvas $p(r)$ tendem a 0 para

Figura 3.20: Distribuições $p(r)$ obtidas através dos ajustes com o método IFT das amostras de oxHDL com diferentes graus de oxidação.

valores de r próximos de 100 Å, indicando que as amostras são formadas praticamente só por monômeros, não sendo necessário o desacoplamento entre o fator de forma e o fator de estrutura. Dessa forma a análise da deconvolução quadrática pode ser realizada diretamente a partir das curvas de intensidade de espalhamento obtidas nas medidas experimentais.

A figura 3.21 apresenta os valores de raio médio calculados, através da equação 3.8, utilizando os valores de raio de giro obtidos nos ajustes com o método IFT. Os valores de raio médio calculados são todos compatíveis entre si, com média de 45,02 Å e desvio padrão da média de 0,24 Å. Assim, as análises realizadas com o método IFT indicam que o raio das partículas de HDL não se altera com a oxidação e que nenhuma das amostras aparenta ter uma parcela significativa de aglomerados, visto que o raio do monômero de HDL varia entre 35 e 60 Å.

Figura 3.21: Valores de raio médio das partículas de HDL calculados através da equação 3.8. A linha contínua representa a média das cinco amostras, que é $45,02 \pm 0,24$ Å.

Análise pelo método de deconvolução quadrática

A partir das curvas de intensidade de espalhamento e do método de deconvolução quadrática foi possível obter o perfil de densidade eletrônica das partículas de HDL. Na figura 3.22 são apresentados os ajustes das curvas de espalhamento obtidos por esse método.

O ajuste pelo método de deconvolução quadrática foi obtido fixando alguns parâmetros: a anisotropia foi fixada em 1,0 pois há um consenso de que as partículas de HDL são esféricas e o programa de análise não mostrou-se suficientemente estável para determinar se há alguma anisotropia nas partículas. O fator de escala de Debye (S_{c2}) foi fixado em zero, fazendo com que não fosse necessário ajustar o raio de giro das cadeias flexíveis de aminoácidos. Em todas as curvas foram ajustados os seguintes parâmetros: raio médio e polidispersão das partículas, constante de fundo, fator de escala S_{c1} (equação 3.17) e as amplitudes de máximos e mínimos.

A figura 3.23 apresenta o contraste de densidade eletrônica entre as amostras de HDL

Figura 3.22: Ajustes do fator de forma obtidos pelo método de deconvolução quadrática para as amostras de naHDL e oxHDL.

e a água (linha vermelha). É possível observar uma variação positiva-negativa entre aproximadamente 40 e 60 $\text{\AA}$. Essa é a região da monocamada de fosfolípidos. Essa região não apresenta variações significativas entre as diferentes amostras, indicando que a densidade eletrônica nos fosfolípidos da HDL não se altera com a oxidação das amostras. Da mesma forma, todas as curvas convergem para zero na mesma região, reforçando a ideia de que não há mudanças no diâmetro das partículas em função da oxidação. Os valores de raio médio obtidos e a polidispersão das amostras podem ser observados na figura 3.24.

No caso específico da amostra oxidada por 5 minutos não foi possível determinar o valor do raio, que foi fixado no valor obtido no ajuste aplicado aos dados da amostra de naHDL. Por isso, na figura 3.24a, o ponto aparece sem incerteza. Essa foi a única amostra que não apresentou estabilidade numérica no ajuste suficiente para determinar o raio médio e a polidispersão ao mesmo tempo. Por isso, escolhemos fixar o raio e ajustar a polidispersão.

Figura 3.23: Contraste médio de densidade eletrônica das partículas de HDL em função de r , distância ao centro da partícula.

É possível observar que a curva de contraste de densidade eletrônica da amostra oxHDL-5min é um pouco diferente das demais curvas, principalmente na região entre 0 a 30 Å (figura 3.23). Provavelmente essa diferença está ligada à instabilidade numérica do ajuste e não por causa de diferenças estruturais nas partículas de HDL oxidadas por 5 minutos.

As curvas de contraste de densidade eletrônica das partículas de HDL (figura 3.23) apresentam bem menos máximos e mínimos do que as curvas de contraste de densidade eletrônica das partículas de LDL (figura 3.16), indicando que há grandes diferenças estruturais entre os dois tipos de lipoproteínas. É possível que as partículas de HDL tenham seu interior menos organizado que as partículas de LDL. Além disso, parte dessas diferenças pode estar associada às diferentes proteínas que cada tipo de lipoproteína possui. Enquanto as partículas de LDL têm apenas a ApoB-100, as de HDL podem conter uma série de proteínas, cuja quantidade varia de partícula para partícula. Assim, as HDLs são

Figura 3.24: a) Raio médio das partículas de HDL em função do tempo de oxidação. b) Polidispersão média do raio das partículas de HDL em função do tempo de oxidação.

mais heterogêneas do que as partículas de LDL e esta heterogeneidade também se reflete nas curvas de contraste de densidade eletrônica das amostras.

Por fim, não é possível observar qualquer diferença estrutural significativa nas curvas de contraste de densidade eletrônica que possa ter sido provocada pela oxidação das amostras. Esse resultado corrobora o obtido nas medidas de ZS, que indicam que as partículas de HDL são mais resistentes à oxidação com cobre do que as partículas de LDL.

3.4.2 Espalhamento dinâmico de luz

Os ajustes das curvas de autocorrelação temporal obtidas nas medidas de DLS das amostras de LDL e HDL foram realizados utilizando rotinas padrão dos programas de aquisição. Esses programas ajustam modelos às curvas de correlação e, a partir do ajuste, calculam o diâmetro médio dos monômeros e aglomerados que compõem as amostras, a partir das frações de intensidade, número e volume.

A figura 3.25a apresenta as curvas de autocorrelação experimentais e os respectivos ajustes. É possível observar que apenas a curva da amostra oxLDL-18h apresenta alguma alteração significativa, quando comparada à curva da naLDL. Essa mudança pode estar relacionada ao aumento da polidispersão da amostra, ou ainda a alguma mudança na forma das partículas. Na figura 3.25b essa alteração reflete-se na largura da distribuição. Além disso, há um pequeno deslocamento para valores maiores de diâmetros em toda a curva. O aumento na largura da distribuição está diretamente relacionado à polidispersão das partículas. O aumento da polidispersão também foi observado nas análises de SAXS (figura 3.17b).

A figura 3.25a apresenta, ainda, uma pequena variação na curva oxLDL-6h, que fica um pouco mais visível a partir de 300 μ s. Essa diferença é mais visível na curva de distribuição de diâmetros (figura 3.25b), na qual é possível perceber um pequeno deslocamento da distribuição.

Figura 3.25: a) Curvas de autocorrelação experimentais das medidas de DLS das amostras de LDL e respectivos ajustes. b) Distribuição de diâmetros das partículas e aglomerados calculada a partir da fração de volume das amostras.

É possível estimar o diâmetro médio das partículas em cada amostra a partir da distribuição de diâmetros (figura 3.25). A estimativa do diâmetro foi definida como sendo o máximo de cada distribuição e a incerteza do diâmetro, como a largura em dois terços da altura. Os valores obtidos nas amostras de LDL são apresentados na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Estimativa de diâmetros médios das amostras de LDL obtidos a partir das distribuições de diâmetros calculadas através da fração de volume.

Amostra	Diâmetro médio (nm)
naLDL	20 ± 6
oxLDL-5min	20 ± 6
oxLDL-30min	20 ± 6
oxLDL-60min	19 ± 6
oxLDL-6h	20 ± 6
oxLDL-18h	21 ± 7

Os ajustes realizados aos resultados experimentais de autocorrelação das amostras de HDL podem ser observados na figura 3.26a. A principal informação presente nessas curvas é o aparecimento de aglomerados de HDL na curva da amostra oxHDL-18h, que é caracterizado pelo decaimento mais lento do que as outras curvas: enquanto a curva de naHDL e dos tempos de oxidação menores chegam próximo de zero em $\tau = 100 \mu s$, a curva de autocorrelação da amostra oxHDL-18h vai a praticamente zero em $\tau = 400 \mu s$. A partir das análises de diâmetro temos que esses aglomerados têm tamanho estimado em 50 ± 17 nm, o que pode explicar o motivo pelo qual eles não foram observados nas medidas de SAXS¹.

Esses aglomerados, possivelmente, são os responsáveis pelo aumento na largura da distribuição que ocorre na curva da amostra oxHDL-18h, como pode ser observado na figura 3.26b. Além disso, há o aparecimento de um ombro que corresponde a um máximo em aproximadamente 53 Å.

Os diâmetros médios das partículas de HDL, apresentados na tabela 3.4, foram estima-

¹Lembrando que a resolução do arranjo das medidas de HDL resolve objetos com até aproximadamente 700 Å.

Figura 3.26: a) Curvas de autocorrelação experimentais das medidas de DLS das amostras de HDL e respectivos ajustes. b) Distribuição de diâmetros das partículas e aglomerados calculada a partir da fração de volume das amostras.

dos com o mesmo procedimento utilizado na estimativa dos diâmetros das amostras de LDL.

Tabela 3.4: Estimativa de diâmetros médios obtidos a partir das distribuições de diâmetros calculadas através da fração de volume das amostras de HDL.

amostra	diâmetro médio (nm)
naHDL	$5,7 \pm 2,3$
oxHDL-5min	$7,0 \pm 2,5$
oxHDL-30min	$7,3 \pm 2,5$
oxHDL-60min	$7,5 \pm 2,9$
oxHDL-18h	8 ± 4

3.5 Sumário dos resultados de caracterização estrutural das lipoproteínas

Os resultados obtidos com a técnica de DLS apresentados na seção anterior expõem algumas diferenças entre as curvas de HDL e LDL. É necessário muito cuidado ao comparar os resultados obtidos com as diferentes amostras pois elas não têm a mesma concentração de partículas por unidade de volume.

Uma primeira diferença interessante é que todas as curvas de autocorrelação das amostras de LDL partem de um mesmo valor maior do que 0,9. Já as curvas da HDL têm início em valores diferentes e, apenas a curva da amostra oxHDL-5min, tem início em um valor maior do que 0,8. É possível que esse fato esteja apenas ligado à normalização realizada por cada programa de análise e que não haja nenhum fenômeno físico por trás. Porém, alguns trabalhos apontam para a possibilidade de haver a superposição de oscilações causadas por vibrações externas ou poeira com o campo elétrico da amostra [70]. Essa superposição afetaria a detecção, influenciando as normalizações e os ajustes, podendo aumentar a incerteza na determinação do diâmetro das partículas. Esse é mais um indício de que os valores de diâmetro médio obtidos nas análises de DLS servem apenas como

estimativas.

Dentro dessa perspectiva, os valores obtidos tanto para LDL quanto para HDL, utilizando o DLS, apresentam o mesmo comportamento daqueles apresentados nos resultados de SAXS: os valores de diâmetro médio das diferentes amostras são compatíveis dentro de um desvio padrão, indicando que a oxidação não altera o diâmetro médio das partículas. Por outro lado, os dados de SAXS indicam que a polidispersão das partículas de LDL aumenta para tempos de oxidação muito grandes (como 18 horas). Já no caso das HDLs não foi encontrado nenhum indício do aumento da polidispersão das partículas em função do tempo de oxidação das amostras.

Os resultados de SAXS também mostraram que as partículas de LDL têm o núcleo organizado em lamelas, que se mantêm, pelo menos em parte, mesmo após a oxidação por 18 horas. Por outro lado, as partículas de HDL parecem ser menos compartimentalizadas do que as de LDL, isto é, suas regiões internas parecem menos organizadas. As curvas de SAXS de HDL não apresentaram máximos associados a distâncias características de repetições, mesmo que difusos. Esse fato indica, portanto, que essas partículas têm pouca ordenação.

As amostras de LDL, mesmo a nativa, apresentaram aglomerados com formato fractal de volume. As análises apontam para um aumento do volume dos agregados, porém a resolução experimental não possibilita obter informações mais precisas sobre esses sistemas. Por outro lado, os resultados indicam que a proporção de aglomerados de HDL nas amostras é pequena ou inexistente. Apenas através da técnica de DLS, e somente para a amostra oxHDL-18h, é que foram encontrados indícios de uma quantidade maior de agregados, que não são observados com a técnica de SAXS por terem o tamanho muito próximo ao da resolução experimental.

As amostras de LDL oxidadas por até 6 horas não apresentaram qualquer alteração em relação à amostra de LDL nativa. Já a amostra oxidada por 18 horas apresentou algumas alterações: aumento da polidispersão, diferenças por todo o perfil de densidade eletrônica

e aumento no fator de escala de Debye.

O aumento da polidispersão das partículas de LDL oxidadas por 18 horas aparece tanto nos dados de SAXS (figura 3.17b) quanto nos dados de DLS (tabela 3.3). Já o perfil de densidade eletrônica difere das demais amostras tanto na região interna quanto na região externa das partículas, conforme pode ser observado na figura 3.16. Essas alterações podem estar associadas a mudanças estruturais. Por último, o aumento do fator de escala de Debye (figura 3.18), que pode estar ligado ao aumento do número de cadeias flexíveis de aminoácidos (que pode ser interpretado como quebras na proteína) ou a mudanças de conformação que levam a quebra de simetria esférica da amostra. Em contrapartida as HDLs não apresentaram qualquer modificação estrutural significativa entre a amostra nativa e a amostra mais oxidada (oxHDL-18h), o que indica que esta lipoproteína é mais resistente à oxidação.

4

Sumário dos resultados, conclusões e perspectivas

Foram estudadas características ópticas e estruturais de lipoproteínas humanas nativas e oxidadas *in vitro* por meio de diversas técnicas experimentais, sendo as principais a Varredura-Z e o Espalhamento de raios X a baixos ângulos.

As análises dos resultados obtidos com a técnica de ZS foram realizadas utilizando-se o modelo da Lente Térmica (LT). Neste modelo entende-se que para que haja a formação da lente térmica são necessárias duas características fundamentais: a capacidade da amostra de absorver a energia do feixe e a velocidade com que o calor se dissipa através dela . No

caso das amostras de LDL, os resultados apresentados na seção 2.4 sugerem que estas características dependem principalmente do conteúdo de antioxidante das partículas e da produção de hidroperóxidos devido à oxidação. É possível que o mesmo mecanismo seja responsável pelo sinal óptico não-linear das HDLs, porém para comprovar essa hipótese são necessários experimentos complementares aos apresentados neste trabalho.

No caso das soluções de LDL foi mostrado que a lente térmica deixa de formar-se, aproximadamente, no mesmo tempo que a fase de iniciação da oxidação termina. Um dos objetivos deste trabalho era entender quais fenômenos físicos estão relacionados a este efeito. Para tanto foram medidos diretamente a absorção linear, o coeficiente termo-óptico, a densidade e o calor específico das amostras com o objetivo de determinar quais desses parâmetros mudam com a evolução do processo de oxidação das amostras. Foi verificado que apenas o coeficiente de absorção linear das amostras altera-se. Porém, a variação que ocorre nos valores de absorção linear não é capaz de explicar toda a diminuição de sinal de ZS, como pode ser observado na figura 2.25. Deste modo, no âmbito do modelo de LT, chega-se à conclusão de que a difusividade térmica (D) das amostras também modifica-se com a evolução do processo de oxidação. O comportamento de D , em função do tempo de oxidação, é similar aquele obtido na quantificação dos hidroperóxidos (figuras 2.24 e 2.26).

A difusividade térmica das amostras de LDL, bem como a produção de hidroperóxidos, apresenta um comportamento crescente em função do tempo de oxidação das amostras. Os produtos da oxidação (PLOOH e ChOOH) são estruturas pequenas e com maior mobilidade, se comparadas com as lipoproteínas. Essas estruturas migram entre as partículas de LDL propagando o calor e o processo oxidativo por toda a amostra. Assim, quanto maior a concentração de PLOOH e ChOOH na amostra, maior será a difusão do calor no meio, impedindo a formação da lente térmica.

A técnica de ZS é sensível a variações durante a fase de iniciação do processo de oxidação (figura 1.3). Quando a quantidade de dienos e hidroperóxidos aumenta muito, a técnica de Varredura-Z não tem mais resolução para distinguir entre o sinal da amostra e o do fundo.

Esta sensibilidade à fase inicial do processo de oxidação é bastante interessante, pois os testes bioquímicos disponíveis não são capazes de identificar diferenças entre amostras de LDL minimamente oxidadas.

Já a técnica SAXS só é capaz de diferenciar amostras oxidadas nas fases mais avançadas. Seus resultados só apresentaram diferenças significativas quando se compara a amostra nativa de LDL com aquela oxidada por 18 horas. As análises dos resultados de SAXS foram realizadas com um novo método, que se mostrou mais adequado frente àqueles existentes na literatura. Foram encontradas diferenças no perfil de densidade eletrônica tanto na parte interna quanto na monocamada de fosfolipídios das LDLs. Além disso, a polidispersão da amostra aumentou com a oxidação e o fator de escala de Debye também. Esse fator pode estar associado tanto a mudanças na simetria da partícula quanto ao aumento do número de cadeias flexíveis de aminoácidos presentes, o que indicaria algumas quebras de partes da ApoB-100.

Ainda em relação aos resultados de SAXS das amostras de LDL, foi verificado que a organização lamelar do colesterol em seus núcleos permanece, pelo menos parcialmente, estruturada mesmo após as 18 horas de oxidação. Todos estes resultados mostram que apesar das partículas de LDL perderem sua função biológica, após um processo de oxidação tão extenso como aquele gerado pelas 18 horas de incubação com cobre, a partícula ainda mantém uma estrutura muito similar à da naLDL. Do ponto de vista clínico talvez fosse interessante voltar-se ao estudo da ApoB-100, empregando estas (e outras) técnicas para compreender melhor suas modificações em função da oxidação das partículas de LDL, pois é provável que a perda da função biológica destas lipoproteínas esteja associada mais intimamente a modificações na estrutura da ApoB-100.

Com relação às HDLs, tanto os resultados de caracterização óptica quanto aqueles de caracterização estrutural apontam para uma maior resistência ao processo de oxidação. Na técnica de ZS, mesmo após uma oxidação por 18 horas, a amostra continua apresentando sinal distinguível do fundo. Assim como no caso da LDL, a oxidação das HDLs apresenta

uma diminuição de θ em função do tempo de oxidação, porém não chegamos à perda total de sinal. Já os resultados de SAXS não constataram qualquer mudança estrutural ocorrida em função da oxidação das amostras de HDL. A técnica de DLS foi a única capaz de acusar alguma mudança, mostrando que a amostra oxHDL-18h tem uma porcentagem não desprezível de agregados, que provavelmente não apareceram nos dados de SAXS por serem maiores do que a resolução experimental.

Avançar no entendimento da HDL seria muito interessante, pois este tipo de lipoproteína é considerado protetor: os estudos clínicos mostram que as pessoas que possuem níveis elevados de HDL apresentam menor probabilidade de desenvolver aterosclerose [8]. Contudo, esse tipo de lipoproteína é muito heterogêneo e pode conter diferentes quantidades e tipos de proteína. Os estudos com a HDL esbarram no problema da quantificação de sua concentração. Como descrito na subseção 2.3.1, a concentração das amostras de LDL em número de partículas é obtida através da quantidade de apolipoproteína, porém este método só funciona porque a LDL tem apenas uma apolipoproteína em sua estrutura (a ApoB-100). No caso da HDL, que pode conter várias apolipoproteínas, essa forma de calcular a concentração, em número de partículas, não é adequada.

Esse problema pode ser contornado usando a mesma amostra “mãe” em todo o conjunto de medidas. Há alguns inconvenientes em usar esse tipo de solução, entretanto essa é uma forma eficaz de se continuar estudando a estrutura e o processo de oxidação das HDLs enquanto não se encontra uma forma de quantificar o número de partículas em uma dada amostra.

Também seria interessante realizar mais medidas com o objetivo de entender como a oxidação da HDL ocorre. A persistência do sinal óptico não-linear poderia ser investigada em medidas conjuntas de ZS, absorção linear e HPLC. Uma abordagem enriquecedora seria comparar a quantidade e o consumo do conteúdo antioxidante, a produção de hidroperóxidos e o sinal de ZS em amostras de LDL e HDL de um mesmo doador oxidadas *in vitro*. É possível que alguma das proteínas que compõem as partículas de HDL tenha

um papel na persistência do sinal óptico não-linear. Uma hipótese a ser averiguada é a de formação de uma quantidade menor de produtos de oxidação. Outra hipótese seria a de que os produtos de oxidação não consigam migrar entre as partículas.

Desenvolvimento do modelo de Lente Térmica

O desenvolvimento do modelo de lente térmica está dividido em quatro partes. Na primeira delas é tratada a variação da temperatura (ΔT) de um material iluminado por um feixe gaussiano. Aqui partimos da equação de difusão do calor. Foram utilizados como base o artigo de 1965 publicado por P.J. Gordon et al. [27] e o livro *Operational Methods in Applied Mathematics* publicado por H. S. Carslaw e J.C. Jaeger [71]. Na segunda parte é determinada a distância focal da lente térmica. As deduções desta seção foram baseadas no artigo de P.J. Gordon, previamente citado, no artigo de J.M. Whinnery [28] e no livro

Principles of Optics de M. Born e E. Wolf [72]. Nas duas últimas seções são explicitadas as transformações que o feixe sofre ao passar por uma amostra, que sofre o efeito de lente térmica, até chegar ao detector. Estas seções são baseadas nos artigos de C.A. Carter e J. Harris [29] e no de J.Harris e J. Dovichi [73].

A.1 Dedução de ΔT

A equação de difusão do calor, em sua forma diferencial, é:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = D \nabla^2 T, \quad (\text{A.1})$$

onde T é a temperatura, t , o tempo e D , é a difusividade térmica da amostra.

Em coordenadas cilíndricas temos

$$\frac{\partial T}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial T}{\partial r} \right). \quad (\text{A.2})$$

A equação A.2 tem como solução, com fluxo em duas dimensões, a integral de A.3 em relação a θ' (que é o ângulo entre r e r'), de 0 a π [71].

$$\frac{V r' dr' d\theta'}{(2\sqrt{\pi Dt})^2} e^{-(r^2 + r'^2 - 2rr' \cos \theta')/4Dt}, \quad (\text{A.3})$$

onde $0 < r < a$ é o raio da amostra que está sendo irradiada e r' é o raio do feixe.

Temos então que

$$T = \frac{V r' dr'}{4\pi Dt} e^{-(r^2 + r'^2)/4Dt} \int_0^\pi e^{(2rr' \cos \theta')/4Dt} d\theta', \quad (\text{A.4})$$

onde V é a intensidade. Esta integral está relacionada a funções de Bessel e tem como

solução [71]:

$$\int_0^\pi e^{(2rr' \cos \theta')/4Dt} d\theta' = 2\pi I_0 \left(\frac{rr'}{2Dt} \right),$$

onde I_0 é a função de Bessel de primeira classe, de ordem 0, modificada.

Como V é intensidade e Q é o calor, podemos escrever

$$Q(r') = 2\pi V r' dr'.$$

Desta forma,

$$T = \frac{Q(r')}{4\pi Dt} \exp \left\{ -\frac{r^2 + r'^2}{4Dt} \right\} I_0 \left(\frac{rr'}{2Dt} \right).$$

A distribuição de temperatura da fonte fica

$$\Delta T(r, t) = \int_0^\infty \int_0^t 2\pi r' T(r', t') dt' dr', \quad (\text{A.5})$$

$$\Delta T(r, t) = \int_0^\infty \int_0^t 2\pi r' \frac{Q(r')}{4\pi Dt'} \exp \left\{ -\frac{r^2 + r'^2}{4Dt'} \right\} I_0 \left(\frac{rr'}{2Dt'} \right) dt' dr' \quad (\text{A.6})$$

O calor por unidade de área por unidade de tempo é proporcional ao quadrado do campo elétrico:

$$Q(r') \propto E^2(r'). \quad (\text{A.7})$$

Podemos escrever o modo principal (TEM_{00}) do campo elétricos de um feixe gaussiano como

$$E(r') = E_0 \exp \left(\frac{-r'^2}{\omega^2} \right). \quad (\text{A.8})$$

Assim, $Q(r')$ fica:

$$Q(r') = A \exp \left(\frac{-2r'^2}{\omega^2} \right) \left[\frac{\text{cal}}{\text{cm} \cdot \text{s}} \right]. \quad (\text{A.9})$$

Simprificando a equação A.6 e substituindo $Q(r')$ conforme a equação A.9, temos:

$$\begin{aligned}\Delta T(r,t) &= \int_0^\infty \int_0^t \frac{Ar'}{2Dt'} \exp\left\{-\frac{2r'^2}{\omega^2}\right\} \exp\left\{-\frac{r^2+r'^2}{4Dt'}\right\} I_0\left(\frac{rr'}{2Dt'}\right) dt' dr', \\ \Delta T(r,t) &= \frac{A}{2D} \int_0^t \frac{1}{t'} \exp\left\{-\frac{r^2}{4Dt'}\right\} \cdot \int_0^\infty \exp\left\{-r'^2\left(\frac{2}{\omega^2} + \frac{1}{4Dt'}\right)\right\} I_0\left(\frac{rr'}{2Dt'}\right) dr' dt' .\end{aligned}$$

Sabemos que

$$\int_0^\infty r' J_0(ar') e^{-p^2 r'^2} dr' = \frac{1}{2p^2} \exp\left\{-\frac{a}{4p^2}\right\},$$

onde a é um número complexo qualquer e $|\arg p| < \frac{\pi}{4}$ para garantir a convergência.

Lembrando que

$$I_0(x) = J_0(ix),$$

temos então que:

$$a = \frac{ir}{2Dt'} \quad e \quad p^2 = \frac{2}{\omega^2} + \frac{1}{4Dt'}$$

Assim,

$$\begin{aligned}\Delta T(r,t) &= \frac{C}{2D} \int_0^t \frac{1}{2t'} \frac{1}{\left(\frac{2}{\omega^2} + \frac{1}{4Dt'}\right)} \exp\left\{-\frac{r^2}{4Dt'}\right\} \exp\left\{-\frac{(-1)r^2}{4D^2t'^2} \cdot \frac{1}{4\left(\frac{2}{\omega^2} + \frac{1}{4Dt'}\right)}\right\} dt', \\ \Delta T(r,t) &= \frac{C}{2D} \int_0^t \frac{1}{2t'} \frac{\omega^2 \cdot 4Dt'}{8Dt' + \omega^2} \exp\left\{-\frac{r^2}{4Dt'}\right\} \exp\left\{-\frac{(-1)r^2}{4D^2t'^2} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{\omega^2 \cdot 4Dt'}{8Dt' + \omega^2}\right\} dt', \\ \Delta T(r,t) &= C \int_0^t \frac{\omega^2}{8Dt' + \omega^2} \exp\left\{-\frac{r^2}{4Dt'}\right\} \exp\left\{\frac{r^2}{4Dt'} \cdot \frac{\omega^2}{8Dt' + \omega^2}\right\} dt', \\ \Delta T(r,t) &= C \int_0^t \frac{\omega^2}{8Dt' + \omega^2} \exp\left\{-\frac{r^2}{4Dt'} \left(1 - \frac{\omega^2}{8Dt' + \omega^2}\right)\right\} dt', \\ \Delta T(r,t) &= C \int_0^t \frac{\omega^2}{8Dt' + \omega^2} \exp\left\{-\frac{r^2}{4Dt'} \left(\frac{\omega^2 + 8Dt' - \omega^2}{\omega^2 + 8Dt'}\right)\right\} dt', \\ \Delta T(r,t) &= C \int_0^t \frac{\omega^2}{8Dt' + \omega^2} \exp\left\{\frac{-2r^2}{\omega^2 + 8Dt'}\right\} dt' .\end{aligned}$$

Fazendo a mudança de variável

$$\begin{aligned} y &= \frac{1}{\omega^2 + 8Dt'}, \\ dy &= -\frac{8D}{(\omega^2 + 8Dt')^2} dt', \\ \text{para } t' = 0 &\rightarrow y = 1/(\omega^2), \\ \text{para } t' = t &\rightarrow y = 1/(\omega^2 + 8Dt), \end{aligned}$$

temos

$$\Delta T(r, t) = -\frac{C\omega^2}{8D} \int_{\omega^{-2}}^{(\omega^2+8Dt)^{-1}} \frac{e^{-2r^2y}}{y} dy, \quad (\text{A.10})$$

$$\Delta T(r, t) = E_i(-2r^2y) \Big|_{\omega^{-2}}^{(\omega^2+8Dt)^{-1}}, \quad (\text{A.11})$$

onde E_i é a função exponencial integral, definida como:

$$E_i(x) = -\int_{-x}^{\infty} \frac{e^{-t}}{t} dt = \int_{\infty}^x \frac{e^{-t}}{t} dt.$$

Desta forma, a equação A.11 fica

$$\Delta T(r, t) = -\frac{C\omega^2}{8D} \left\{ E_i \left(\frac{-2r^2}{\omega^2 + 8Dt} \right) - E_i \left(\frac{-2r^2}{\omega^2} \right) \right\}, \quad (\text{A.12})$$

$$\Delta T(r, t) = \frac{C\omega^2}{8D} \left\{ E_i \left(\frac{-2r^2}{\omega^2} \right) - E_i \left(\frac{-2r^2}{\omega^2 + 8Dt} \right) \right\}. \quad (\text{A.13})$$

Vamos chamar $\omega^2/(4D) = t_c$. Temos então que:

$$\frac{-2r^2}{\omega^2 + 8Dt} = \frac{-2r^2}{\omega^2} \cdot \frac{1}{1 + \frac{8Dt}{\omega^2}} = \frac{-2r^2}{\omega^2} \cdot \frac{1}{1 + 2t/t_c}. \quad (\text{A.14})$$

Substituindo a relação A.14 na equação A.13, temos

$$\Delta T(r,t) = -\frac{C\omega^2}{8D} \left\{ E_i \left[\frac{-2r^2}{\omega^2} \right] - E_i \left[\frac{-2r^2}{\omega^2} \cdot \frac{1}{1 + 2t/t_c} \right] \right\}. \quad (\text{A.15})$$

Podemos escrever a potência total do feixe (P^*) como:

$$P^* = \int_0^a 2\pi r \omega(r) dr. \quad (\text{A.16})$$

Além disso podemos escrever Q como sendo a densidade de potência em W/cm^2 vezes 0,24 (que é a conversão de watts para calorias) vezes a dissipação fracionária por centímetro (b):

$$Q(r) = 0,24b\omega(r). \quad (\text{A.17})$$

Igualando (A.9) a (A.17), temos:

$$\begin{aligned} 0,24b\omega(r) &= C \exp \left\{ -\frac{2r^2}{\omega^2} \right\}, \\ \omega(r) &= \frac{C}{0,24b} \exp \left\{ -\frac{2r^2}{\omega^2} \right\}. \end{aligned}$$

Substituindo $\omega(r)$ em (A.16):

$$P^* = \int_0^a \frac{2\pi C r}{0,24b} \exp \left\{ -\frac{2r^2}{\omega^2} \right\} dr, \quad (\text{A.18})$$

$$P^* = \frac{2\pi C}{0,24b} \int_0^a r \cdot \exp \left\{ -\frac{2r^2}{\omega^2} \right\} dr. \quad (\text{A.19})$$

É possível resolver a integral da equação A.19 fazendo a seguinte mudança de variável:

$u = r^2 \rightarrow du = 2r dr$. Temos então:

$$\begin{aligned}
P^* &= \frac{2\pi C}{0,24b} \int_0^{a^2} \frac{1}{2} \exp \left\{ -\frac{2u}{\omega^2} \right\} du, \\
P^* &= \frac{2\pi C}{0,24b} \left[\frac{1}{2} \left(-\frac{\omega^2}{2} \right) \exp \left\{ -\frac{2u}{\omega^2} \right\} \right]_0^{a^2}, \\
P^* &= \frac{\pi C}{0,24b} \frac{\omega^2}{2} [1 - e^{(-2a^2/\omega^2)}].
\end{aligned}$$

Apenas a área do feixe com raio $a \ll \omega$ interessa, pois apenas a parte do feixe gaussiano com grande intensidade é capaz de causar o efeito da lente térmica. Temos então:

$$P^* \simeq \frac{C\omega^2\pi}{0,48b}. \quad (\text{A.20})$$

Desta forma

$$C\omega^2 \simeq \frac{0,48bP^*}{\pi}. \quad (\text{A.21})$$

Substituindo a igualdade A.21 na equação A.15 temos:

$$\Delta T(r,t) = \frac{0,48bP^*}{8\pi D} \left\{ E_i \left[-\frac{2r^2}{\omega^2} \right] - E_i \left[-\frac{2r^2}{\omega^2} \cdot \frac{1}{1 + 2t/t_c} \right] \right\}, \quad (\text{A.22})$$

$$\Delta T(r,t) = \frac{0,24bP^*}{4\pi D} \left\{ E_i \left[-\frac{2r^2}{\omega^2} \right] - E_i \left[-\frac{2r^2}{\omega^2} \cdot \frac{1}{1 + 2t/t_c} \right] \right\}. \quad (\text{A.23})$$

Para fazer a equivalência da equação do ΔT acima e da equação (1) do artigo de Carter (referência [29]) temos que considerar que toda energia absorvida é dissipada ($b=1$). Temos ainda que colocar um termo multiplicativo pois a absorção não é total ($2,303A/L$), onde $A = \log(1 - \alpha)$, α é a absorptância da amostra (que é a fração de luz absorvida pela amostra num comprimento de onda específico) e L é a espessura da amostra. Além disso, a potência (P^*) da equação (A.23) tem unidade de cal/s e por isso tem que ser multiplicada por 0,24. Na equação (A.24), P tem unidade de W . Desta forma:

$$\Delta T(r,t) = \frac{P}{4\pi D} \left(2,303 \frac{A}{L} \right) \left\{ E_i \left[-\frac{2r^2}{\omega^2} \right] - E_i \left[-\frac{2r^2}{\omega^2} \cdot \frac{1}{1 + 2t/t_c} \right] \right\}. \quad (\text{A.24})$$

A.2 Determinação da distância focal da lente térmica

O índice de refração (n) de um meio, que muda com o feixe, pode ser escrito como:

$$n(r) = n_0 \left[1 + \frac{\delta r^2}{\omega^2} \right]. \quad (\text{A.25})$$

Figura A.1: Desenho esquemático de um feixe passando pela amostra que sofre o efeito da lente térmica. Adaptado de [27].

De acordo com o esquema da figura A.1 $\tan \theta = \frac{r}{F}$, que para ângulos pequenos torna-se $\theta \simeq \frac{r}{F}$. Da mesma forma,

$$\sin \theta = \frac{l}{R} \Rightarrow \theta \simeq \frac{l}{R}.$$

Temos então

$$F \simeq \frac{r}{\theta} \simeq \frac{rR}{l}. \quad (\text{A.26})$$

O próximo passo é escrever o raio de curvatura (R) em função do índice de refração.

Considere uma onda plana com caminho óptico $\mathfrak{F}$ e direção de propagação $\vec{k}$. Temos que

$$\mathfrak{F} = \vec{k} \cdot \vec{r} = kr \cos \theta.$$

Vamos agora definir um vetor unitário $\vec{s}$ de forma que:

$$\vec{s} = \frac{\vec{\nabla} \mathfrak{F}}{n} = \frac{1}{n} \frac{d\mathfrak{F}}{d\vec{r}}. \quad (\text{A.27})$$

Figura A.2: Esquema da relação entre $d\vec{r}$ e ds .

De acordo com a figura A.2, temos que:

$$d\vec{r} = ds \cdot \vec{s}. \quad (\text{A.28})$$

Das equações (A.27) e (A.28) temos:

$$\vec{s} = \frac{d\vec{r}}{ds}, \quad (\text{A.29})$$

$$\frac{d\vec{r}}{ds} = \frac{\vec{\nabla}\mathfrak{F}}{n}, \quad (\text{A.30})$$

$$n \frac{d\vec{r}}{ds} = \vec{\nabla}\mathfrak{F}. \quad (\text{A.31})$$

Derivando a equação (A.31) em relação a s :

$$\begin{aligned} \frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) &= \frac{d}{ds} \vec{\nabla}\mathfrak{F}, \\ \frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) &= \frac{d}{d\vec{r}} \frac{d\vec{r}}{ds} \vec{\nabla}\mathfrak{F}, \\ \frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) &= \frac{d\vec{r}}{ds} \cdot \vec{\nabla}(\vec{\nabla}\mathfrak{F}), \\ \frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) &= \frac{1}{n} \vec{\nabla}\mathfrak{F} \cdot \vec{\nabla}(\vec{\nabla}\mathfrak{F}). \end{aligned}$$

Lembrando da relação

$$\vec{\nabla}(fg) = f(\vec{\nabla}g) + g(\vec{\nabla}f),$$

temos que:

$$\begin{aligned} \vec{\nabla}[(\vec{\nabla}\mathfrak{F})(\vec{\nabla}\mathfrak{F})] &= (\vec{\nabla}\mathfrak{F}) \cdot \vec{\nabla}(\vec{\nabla}\mathfrak{F}) + (\vec{\nabla}\mathfrak{F}) \cdot \vec{\nabla}(\vec{\nabla}\mathfrak{F}), \\ \vec{\nabla}[(\vec{\nabla}\mathfrak{F})^2] &= 2(\vec{\nabla}\mathfrak{F}) \cdot \vec{\nabla}(\vec{\nabla}\mathfrak{F}), \\ (\vec{\nabla}\mathfrak{F}) \cdot \vec{\nabla}(\vec{\nabla}\mathfrak{F}) &= \frac{1}{2} \vec{\nabla}[(\vec{\nabla}\mathfrak{F})^2]. \end{aligned}$$

Desta forma

$$\frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) = \frac{1}{2} \vec{\nabla}[(\vec{\nabla}\mathfrak{F})^2]. \quad (\text{A.32})$$

Partindo das equações de Maxwell podemos chegar à *Equação Eikonal* [74]:

$$(\vec{\nabla}\mathfrak{F})^2 = n^2. \quad (\text{A.33})$$

Assim, a equação A.32 fica:

$$\frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) = \frac{1}{2} \vec{\nabla} n^2, \quad (\text{A.34})$$

$$\frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) = \frac{1}{2} 2n \vec{\nabla} n, \quad (\text{A.35})$$

$$\frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) = \vec{\nabla} n. \quad (\text{A.36})$$

Derivando $\mathfrak{F}$ em relação a s , temos:

$$\frac{d\mathfrak{F}}{ds} = \frac{d\mathfrak{F}}{d\vec{r}} \frac{d\vec{r}}{ds}, \quad (\text{A.37})$$

$$\frac{d\mathfrak{F}}{ds} = \vec{\nabla} \mathfrak{F} \frac{d\vec{r}}{ds}, \quad (\text{A.38})$$

$$\frac{d\mathfrak{F}}{ds} = \vec{\nabla} \mathfrak{F} \frac{1}{n} \vec{\nabla} \mathfrak{F}, \quad (\text{A.39})$$

$$\frac{d\mathfrak{F}}{ds} = \frac{1}{n} (\vec{\nabla} \mathfrak{F})^2. \quad (\text{A.40})$$

Substituindo a equação (A.33) na equação A.40,

$$\frac{d\mathfrak{F}}{ds} = \frac{1}{n} n^2 = n$$

Para um caso geral pode-se escrever o vetor de curvatura de um raio de luz como

$$\vec{K} = \frac{d\vec{s}}{ds} = \frac{1}{R} \vec{\nu},$$

onde $1/R$ é o recíproco da magnitude da curvatura da lente e $\vec{\nu}$ é um vetor unitário na direção normal à direção de propagação do raio de luz (conforme a figura A.3).

Figura A.3: Esquema dos vetores $\vec{s}$ e $\vec{v}$. Figura retirada de [72].

Temos então que

$$\begin{aligned}\vec{K} &= \frac{d}{ds} \vec{s}, \\ \vec{K} &= \frac{d}{ds} \left(\frac{d\vec{r}}{ds} \right), \\ n\vec{K} &= \frac{d}{ds} \left(n \frac{d\vec{r}}{ds} \right) - \frac{dn}{ds} \frac{d\vec{r}}{ds}.\end{aligned}\tag{A.41}$$

Usando a igualdade A.36 na equação A.41, temos:

$$n\vec{K} = \vec{\nabla}n - \frac{dn}{ds} \vec{s}.\tag{A.42}$$

Desta forma,

$$|\vec{K}| = \frac{1}{R} |\vec{v}| = \frac{1}{R},$$

lembrando que $\vec{v}$ é um vetor unitário.

Podemos ainda escrever $|\vec{K}|$ como:

$$|\vec{K}| = \frac{\vec{v}}{n} \cdot \left(\vec{\nabla}n - \frac{dn}{ds} \vec{s} \right).\tag{A.43}$$

Como $\vec{s}$ e $\vec{v}$ são ortogonais, o segundo termo do lado direito da equação A.43 é zero.

Assim

$$\begin{aligned} |\vec{K}| &= \vec{\nu} \cdot \frac{1}{n} \vec{\nabla} n, \\ |\vec{K}| &= \vec{\nu} \cdot \vec{\nabla} \log n = \frac{1}{R} \end{aligned} \quad (\text{A.44})$$

O sinal da equação (A.44) será positivo se o feixe de luz convergir após passar pela lente e negativo se a lente divergir o feixe.

No caso da figura A.1, o feixe diverge após passar pela lente térmica, desta forma:

$$\frac{1}{R} = -\vec{\nu} \cdot \vec{\nabla} \log n = -\frac{1}{n} \frac{dn}{dr}.$$

Usando a equação (A.25), temos que

$$\frac{1}{R} = -\frac{1}{n} \frac{2n_0 \delta r}{\omega^2}.$$

Se $n \simeq n_0$, ou seja, o efeito não-linear é pequeno:

$$\frac{1}{R} = -\frac{2\delta r}{\omega^2}. \quad (\text{A.45})$$

Substituindo a equação (A.45) na equação (A.26), temos:

$$F \simeq -\frac{r\omega^2}{2\delta r L} = -\frac{\omega^2}{2\delta L},$$

onde δ é uma pequena mudança em n . Porém é preciso levar em conta que há uma mudança de meio que refrata o feixe. Desta forma

$$F = -\frac{\omega^2}{2\delta n_0 L}. \quad (\text{A.46})$$

Para um aumento de temperatura ΔT , o índice de refração muda conforme a equação

A.47

$$n(r,t) = n_0 + \frac{dn}{dT} \Delta T(r,t). \quad (\text{A.47})$$

Substituindo ΔT obtido anteriormente (equação A.24), temos:

$$n(r,t) = n_0 + \frac{dn}{dT} \frac{0,48bP}{8\pi\kappa} \left\{ E_i \left(\frac{-2r^2}{\omega^2} \right) - E_i \left(\frac{-2r^2}{\omega^2 + 8Dt} \right) \right\}. \quad (\text{A.48})$$

A função exponencial integral pode ser escrita como uma série [27]:

$$E_i(-x) \simeq \ln(\gamma x) - x,$$

onde γ é a constante de Euler-Mascheroni.

Desta forma,

$$\begin{aligned} E_i \left(-\frac{2r^2}{\omega^2} \right) &= \ln \left(\frac{\gamma 2r^2}{\omega^2} \right) - \frac{2r^2}{\omega^2}, \\ E_i \left(-\frac{2r^2}{\omega^2 + 8Dt} \right) &= \ln \left(\frac{\gamma 2r^2}{\omega^2 + 8Dt} \right) - \frac{2r^2}{\omega^2 + 8Dt}. \end{aligned} \quad (\text{A.49})$$

Substituindo a equação A.49 na equação A.48, n fica

$$n(r,t) = n_0 + \frac{dn}{dT} \frac{P}{4\pi\kappa} \left(2,303 \frac{A}{L} \right) \left\{ \ln \left(\frac{\gamma 2r^2}{\omega^2} \right) - \frac{2r^2}{\omega^2} - \ln \left(\frac{\gamma 2r^2}{\omega^2 + 8Dt} \right) + \frac{2r^2}{\omega^2 + 8Dt} \right\}.$$

Lembrando que $\ln(a) - \ln(b) = \ln(a/b)$,

$$\begin{aligned} n(r,t) &= n_0 + \frac{dn}{dT} \frac{P}{4\pi\kappa} \left(2,303 \frac{A}{L} \right) \left\{ \ln \left(\frac{\gamma 2r^2}{\omega^2} \cdot \frac{\omega^2(t_c + 2t)}{\gamma 2r^2 t_c} \right) - \frac{2r^2}{\omega^2} \left(1 - \frac{t_c}{t_c + 2t} \right) \right\}, \\ n(r,t) &= n_0 + \frac{dn}{dT} \frac{P}{4\pi\kappa} \left(2,303 \frac{A}{L} \right) \left\{ \ln \left(\frac{t_c + 2t}{t_c} \right) - \frac{2r^2}{\omega^2} \left(1 - \frac{t_c}{t_c + 2t} \right) \right\}. \end{aligned}$$

A partir da equação (A.25) temos que

$$\frac{n_0 \delta r^2}{\omega^2} = \left(\frac{dn}{dT} \right) \frac{P}{4\pi\kappa} \left(2,303 \frac{A}{L} \right) \left\{ \ln \left(1 + \frac{2t}{t_c} \right) - \frac{2r^2}{\omega^2} \left(1 - \frac{t_c}{t_c + 2t} \right) \right\} \quad (\text{A.50})$$

Podemos desprezar o termo $\ln(1 + 2t/t_c)$ por ser muito pequeno. Desta forma a equação A.50 fica

$$\begin{aligned} \delta &= -\frac{\omega^2}{n_0 r^2} \left(\frac{dn}{dT} \right) \frac{P}{4\pi\kappa} \left(2,303 \frac{A}{L} \right) \frac{2r^2}{\omega^2} \left(1 - \frac{t_c}{t_c + 2t} \right), \\ \delta &= -\frac{dn}{dT} \frac{P}{2\pi\kappa n_0} 2,303 \frac{A}{L} \left(1 - \frac{t_c}{2t + t_c} \right), \\ \delta &= -\frac{dn}{dT} \frac{2,303 P A}{2\pi\kappa n_0 L} \left(\frac{2t}{2t + t_c} \right). \end{aligned}$$

Substituindo δ na equação A.46, temos:

$$F = \frac{\pi\kappa\omega^2}{2,303 P A (dn/dT)} \left(1 + \frac{t_c}{2t} \right). \quad (\text{A.51})$$

Podemos reescrever $F(t)$ como

$$F(t) = f(\infty) \left[1 + \frac{t_c}{2t} \right],$$

onde

$$f(\infty) = \frac{\pi\kappa\omega^2}{2,303 P A (dn/dT)}. \quad (\text{A.52})$$

A.3 Modificação do feixe (laser) pela lente térmica

O efeito da lente térmica pode ser interpretado fisicamente como a mudança da curvatura da fase das frentes de onda e, desta forma, a taxa na qual o feixe expande.

Seja

$$I(z) = I_{bc} \exp \left(-\frac{2r^2}{\omega^2(z)} \right),$$

onde I_{bc} é a intensidade de luz no centro do feixe (figura A.4).

Figura A.4: Desenho esquemático da relação entre ω_0 , ω_1 e ω_2 .

Conforme a figura A.4 temos que para $z = Z_1 + Z_2 \Rightarrow \omega(z) = \omega_2$. Desta forma

$$I(Z_1 + Z_2) = I_{bc} \exp \left(-\frac{2r^2}{\omega_2^2} \right).$$

Vamos agora encontrar a relação entre a potência do feixe (P) e a intensidade I_{bc} :

$$\begin{aligned} P &= \int \int I dx dy = \int_0^{2\pi} \int_0^\infty I r dr d\theta, \\ P &= 2\pi I_{bc} \int_0^\infty \exp \left(-\frac{2r^2}{\omega_2^2} \right) r dr. \end{aligned}$$

Fazendo a mudança de variável $r^2 = u \Rightarrow 2rdr = du$:

$$\begin{aligned}
 P &= 2\pi I_{bc} \int_0^\infty \exp\left(-\frac{2u}{\omega_2^2}\right) \frac{du}{2} \\
 P &= \pi I_{bc} \left(-\frac{\omega_2^2}{2}\right) \exp\left(-\frac{2u}{\omega_2^2}\right) \Big|_0^\infty \\
 P &= \pi I_{bc} \frac{\omega_2^2}{2} \\
 I_{bc} &= \frac{2P}{\pi\omega_2^2}
 \end{aligned} \tag{A.53}$$

A mudança relativa em I_{bc} antes e depois da lente térmica se formar pode ser escrita como

$$\frac{I_{bc}(t=0) - I_{bc}(t=\infty)}{I_{bc}(t=0)} = \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}}, \tag{A.54}$$

Substituindo a equação A.53 na equação A.54, temos:

$$\begin{aligned}
 \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \frac{\frac{2p}{\pi\omega_2^2(t=0)} - \frac{2p}{\pi\omega_2^2(t=\infty)}}{\frac{2p}{\pi\omega_2^2(t=\infty)}} \\
 \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \frac{\frac{1}{\omega_2^2(t=0)} - \frac{1}{\omega_2^2(t=\infty)}}{\frac{1}{\omega_2^2(t=\infty)}} \\
 \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \left[\frac{1}{\omega_2^2(t=0)} - \frac{1}{\omega_2^2(t=\infty)} \right] \omega_2^2(t=\infty) \\
 \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \left[\frac{\omega_2^2(t=\infty) - \omega_2^2(t=0)}{\omega_2^2(t=0)\omega_2^2(t=\infty)} \right] \omega_2^2(t=\infty) \\
 \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \frac{\omega_2^2(t=\infty) - \omega_2^2(t=0)}{\omega_2^2(t=0)}
 \end{aligned}$$

Desta forma

$$\frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} = \frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} \tag{A.55}$$

A.4 A propagação do feixe

O módulo do campo elétrico ($\vec{E}$) de um feixe gaussiano (TEM_{00}) pode ser escrito como

$$E(r,z) = \frac{E_0\omega_0}{\omega} \exp \left\{ -i \left(\frac{2\pi z}{\lambda} - \phi \right) - \frac{i\pi r^2}{\lambda R} - \frac{r^2}{\omega^2} \right\}. \quad (\text{A.56})$$

Os dois primeiros termos da exponencial do campo denotam, respectivamente, a fase longitudinal e transversal da onda. R é o raio de curvatura da superfície esférica de fase constante. Sendo que

$$R = z \left(1 + \frac{z_0^2}{z^2} \right), \quad (\text{A.57})$$

$$z_0 = \frac{\pi\omega_0^2}{\lambda}. \quad (\text{A.58})$$

Já o último termo da exponencial do módulo do campo elétrico expressa o perfil da amplitude radial, que é uma gaussiana com largura de um desvio padrão igual a ω :

$$\omega^2 = \omega_0^2 \left(1 + \frac{z^2}{z_0^2} \right). \quad (\text{A.59})$$

A origem da frente de onda ($z = 0$) ocorre na cintura do feixe, onde a largura do feixe (gaussiano) é mínima (ω_0), e o raio de curvatura é infinito isto é, uma onda plana. Na região do campo distante, onde $z \gg z_0$, a largura do feixe cresce linearmente com a propagação. Equivalentemente, a divergência do feixe (φ) se torna constante:

$$\varphi = \arctan \left(\frac{\omega}{z} \right) \simeq \frac{\omega}{z} = \frac{\lambda}{\pi\omega_0}.$$

Toda a informação necessária para descrever a propagação do feixe gaussiano, a partir de um ponto qualquer z , pode ser expressa em um único parâmetro q , chamado de raio

complexo do feixe:

$$\frac{1}{q(z)} = \frac{1}{R(z)} - \frac{i\lambda}{\pi\omega^2(z)}. \quad (\text{A.60})$$

O efeito de um elemento óptico no feixe pode ser determinado por um efeito em q :

$$\frac{1}{q_2} = \frac{1}{q_1} - \frac{1}{f}.$$

Podemos escrever q_2 em função dos elementos da matriz ABCD:

$$q_2 = \frac{Aq_1 + B}{Cq_1 + D}.$$

E a partir das equações A.60 e A.4 podemos escrever R e ω em um sistema com a origem na cintura do feixe ($\omega(0) = \omega_0$):

$$\begin{aligned} R &= \frac{A^2 z_0^2 + B^2}{AC z_0^2 + BD}, \\ \omega^2 &= \frac{\lambda}{\pi} \left[\frac{A^2 z_0^2 + B^2}{(AD - BC)z_0} \right]. \end{aligned}$$

Quando o índice de refração após o elemento óptico é o mesmo de antes dele, o determinante da matriz ABCD é 1 isto é, $AD - BC = 1$. Desta forma:

$$\omega^2 = \frac{\lambda}{\pi} \left[\frac{A^2 z_0^2 + B^2}{z_0} \right].$$

Utilizando a relação entre z_0 e ω_0 (equação A.58), temos:

$$\begin{aligned} \omega^2 &= \frac{\omega_0^2}{z_0} \left[\frac{A^2 z_0^2 + B^2}{z_0} \right], \\ \omega^2 &= \omega_0^2 \left[A^2 + \frac{B^2}{z_0^2} \right]. \end{aligned} \quad (\text{A.61})$$

Temos agora que determinar quem são os elementos A e B da matriz. Nossa matriz

ABCD é composta por três matrizes de transferência: duas de propagação no espaço livre e uma de propagação através de uma lente delgada.

$$\begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & z_2 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ -1/f & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & z_1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix},$$

que tem como resultado

$$\begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 - \frac{z_2}{f} & z_1 + z_2 - \frac{z_1 z_2}{f} \\ -\frac{1}{f} & 1 - \frac{z_1}{f} \end{bmatrix}.$$

Temos então que A e B são dados por:

$$\begin{aligned} A &= 1 - \frac{z_2}{f}, \\ B &= z_1 + z_2 - \frac{z_1 z_2}{f}. \end{aligned}$$

Substituindo os valores de A e B na equação A.61 para o ponto z_2 , temos

$$\omega_2^2 = \omega_0^2 \left[\left(1 - \frac{z_2}{f}\right)^2 + \left(z_1 + z_2 - \frac{z_1 z_2}{f}\right)^2 \frac{1}{z_0^2} \right].$$

No campo distante temos que $z_2 \gg 1$ e $z_2 \gg z_1$. Podemos então fazer as aproximações

$$\begin{aligned} \left(1 - \frac{z_2}{f}\right)^2 &\simeq \left(-\frac{z_2}{f}\right)^2, \\ \left(z_1 + z_2 - \frac{z_1 z_2}{f}\right)^2 &\simeq \left(z_2 - \frac{z_1 z_2}{f}\right)^2. \end{aligned}$$

Desta forma,

$$\begin{aligned}\omega_2^2 &= \omega_0^2 z_2^2 \left[\left(\frac{1}{f} \right)^2 + \left(1 - \frac{z_1}{f} \right)^2 \frac{1}{z_0^2} \right], \\ \omega_2^2(t=0) &= \omega_0^2 z_2^2 \left[\left(\frac{1}{f(0)} \right)^2 + \left(1 - \frac{z_1}{f(0)} \right)^2 \frac{1}{z_0^2} \right],\end{aligned}$$

lembrando que $f(0) = \infty$

$$\omega_2^2(t=0) = \frac{\omega_0^2 z_2^2}{z_0^2}.$$

Para $t = \infty$

$$\begin{aligned}\omega_2^2(t = \infty) &= \omega_0^2 z_2^2 \left[\left(\frac{1}{f(\infty)} \right)^2 + \left(1 - \frac{z_1}{f(\infty)} \right)^2 \frac{1}{z_0^2} \right], \\ \omega_2^2(t = \infty) &= \frac{\omega_0^2 z_2^2}{z_0^2} \left[\left(\frac{z_0}{f(\infty)} \right)^2 + \left(1 - \frac{z_1}{f(\infty)} \right)^2 \frac{1}{z_0^2} \right].\end{aligned}$$

Temos então que

$$\begin{aligned}\frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= \frac{\frac{\omega_0^2 z_2^2}{z_0^2} \left[\left(\frac{z_0}{f(\infty)} \right)^2 + \left(1 - \frac{z_1}{f(\infty)} \right)^2 \right] - \frac{\omega_0^2 z_2^2}{z_0^2}}{\frac{\omega_0^2 z_2^2}{z_0^2}}, \\ \frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= \left(\frac{z_0}{f(\infty)} \right)^2 + 1 - \frac{2z_1}{f(\infty)} + \left(\frac{z_1}{f(\infty)} \right)^2 - 1, \\ \frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= -\frac{2z_1}{f(\infty)} + \left(\frac{z_0^2 + z_1^2}{f^2(\infty)} \right).\end{aligned}$$

Para caracterizar a dependência do fenômeno da lente térmica com a posição da amostra (z_1), vamos substituir as equações A.52 e A.59 em $\Delta\omega_2^2/\omega_2^2$, mas vamos nos restringir ao

caso da lente fraca. Neste caso o termo linear domina pois $f^2(\infty) \gg z_1^2 + z_2^2$. Temos:

$$\begin{aligned}\frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &\simeq -\frac{2z_1}{f(\infty)}, \\ \frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= -2z_1 \frac{2,303PA}{\pi\kappa\omega^2} \frac{dn}{dT}, \\ \frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= -2z_1 \frac{2,303PA}{\pi\kappa\omega_0^2 \left[1 + \frac{z_1^2}{z_0^2}\right]} \frac{dn}{dT}, \\ \frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= \frac{-2,303PA}{\pi\kappa\omega_0^2} \left[\frac{2z_1 z_0^2}{z_0^2 + z_1^2} \right] \frac{dn}{dT}.\end{aligned}$$

Usando a relação entre ω_0 e z_0 temos

$$\begin{aligned}\frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= \frac{-2,303PA}{\pi\kappa} \frac{\pi}{\lambda z_0} \left[\frac{2z_1 z_0^2}{z_0^2 + z_1^2} \right] \frac{dn}{dT}, \\ \frac{\Delta\omega_2^2}{\omega_2^2} &= \frac{-2,303PA}{\pi\kappa} \left[\frac{2z_1 z_0}{z_0^2 + z_1^2} \right] \frac{dn}{dT}.\end{aligned}$$

Vamos agora achar a posição z_1 na qual o fenômeno é máximo:

$$\begin{aligned}\frac{\partial(\Delta\omega_2^2/\omega_2^2)}{\partial z_1} &= 0, \\ \frac{-2,303PA}{\pi\kappa} \frac{dn}{dT} \frac{\partial}{\partial z_1} \left[\frac{2z_1 z_0}{z_0^2 + z_1^2} \right] &= 0, \\ \frac{\partial}{\partial z_1} \left[\frac{2z_1 z_0}{z_0^2 + z_1^2} \right] &= \frac{2z_0}{z_1^2 + z_0^2} - \frac{2z_1 z_0}{(z_1^2 + z_0^2)^2} 2z_1 = 0, \\ 2z_0 - \frac{4z_1^2 z_0}{z_1^2 + z_0^2} &= 0, \\ 2z_0 &= \frac{4z_1^2 z_0}{z_1^2 + z_0^2}, \\ 2z_0 z_1^2 + 2z_0^3 - 4z_1^2 z_0 &= 0, \\ 2z_0 z_1^2 - 2z_0^3 &= 0, \\ z_1^2 &= z_0^2.\end{aligned}$$

O efeito da lente térmica será máximo quando a amostra for posicionada em $z_0 = \pi\omega_0^2/\lambda$.

Recalculando $\Delta I_{bc}/I_{bc}$ para uma lente qualquer no ponto $z_1 = z_0$, não podemos desconsiderar o termo $\frac{z_1^2 + z_0^2}{f^2(\infty)}$, como foi feito anteriormente. Temos então que

$$\frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} = \frac{-2z_0}{f(\infty)} + 2 \left(\frac{z_0}{f(\infty)} \right)^2. \quad (\text{A.62})$$

Substituindo $f(\infty)$ (equação A.52) e ω^2 (equação A.59) na equação A.62, temos:

$$\frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} = -2z_0 \frac{2,303PA}{\lambda\kappa} \frac{dn}{dT} \left(\frac{z_0}{z_0^2 + z_0^2} \right) + 2z_0^2 \left[\frac{2,303PA}{\lambda\kappa} \frac{dn}{dT} \right]^2 \left(\frac{z_0}{z_0^2 + z_0^2} \right)^2.$$

Definindo

$$\theta = -\frac{2,303PA}{\lambda\kappa} \frac{dn}{dT},$$

temos

$$\begin{aligned} \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= 2\theta \frac{z_0^2}{2z_0^2} + 2\theta^2 \left(\frac{z_0^2}{2z_0^2} \right)^2, \\ \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \theta + \frac{\theta^2}{2}. \end{aligned}$$

Agora vamos generalizar para qualquer posição da amostra:

$$\frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} = \frac{-2z}{f(\infty)} + \frac{z_0^2 + z^2}{f(\infty)},$$

$$\frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} = -2z \frac{2,303PA}{\pi\kappa\omega_0^2 \left[1 + \frac{z^2}{z_0^2} \right]} \frac{dn}{dT} + \left(\frac{2,303PA}{\pi\kappa\omega_0^2 \left[1 + \frac{z^2}{z_0^2} \right]} \right)^2 \left(\frac{dn}{dT} \right) (z_0^2 + z^2),$$

$$\begin{aligned} \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \frac{2\theta(z/z_0)}{1 + (z^2/z_0^2)} - \frac{\theta^2[1 + (z^2/z_0^2)]}{[1 + (z^2/z_0^2)]^2}, \\ \frac{\Delta I_{bc}}{I_{bc}} &= \frac{2\theta(z/z_0)}{1 + (z^2/z_0^2)} - \frac{\theta^2}{1 + (z^2/z_0^2)}. \end{aligned}$$

Por último vamos generalizar para qualquer tempo (t):

$$\frac{I(0) - I(t)}{I(t)} = \frac{-2z}{f(t)} + \frac{z_0^2 + z^2}{f(t)}. \quad (\text{A.63})$$

Lembrando que $f(t) = f(\infty)[1 + (t_c/2t)]$

$$\begin{aligned} f(\infty) &= \frac{\pi\kappa\omega_0^2[1 + (z/z_0)^2]}{2,303PA(dn/dT)}, \\ f(\infty) &= \frac{\pi\kappa}{2,303PA(dn/dT)} \frac{z_0\lambda}{\pi} [1 + (z/z_0)^2], \\ f(\infty) &= -\frac{1}{\theta} z_0 [1 + (z/z_0)^2]. \end{aligned}$$

Temos que $f(t)$ será:

$$f(t) = -\frac{1}{\theta} z_0 [1 + (z/z_0)^2] \left(1 + \frac{t_c}{2t}\right). \quad (\text{A.64})$$

Substituindo a equação A.64 na equação A.63, temos:

$$\begin{aligned} \frac{I(0)}{I(t)} - 1 &= -2z \frac{-\theta}{[1 + (t_c/2t)]} \frac{1}{z_0[1 + (z/z_0)^2]} + (z_0^2 + z^2) \frac{(-\theta)^2}{[1 + (t_c/2t)]^2} \frac{1}{z_0^2[1 + (z/z_0)^2]^2}, \\ \frac{I(0)}{I(t)} - 1 &= \frac{\theta}{[1 + (t_c/2t)]} \left[\frac{2(z/z_0)}{1 + (z/z_0)^2} \right] + \frac{\theta^2}{[1 + (t_c/2t)]^2} \left[\frac{1}{1 + (z/z_0)^2} \right]. \end{aligned}$$

Usando a seguinte relação:

$$\begin{aligned} tc &= \frac{\omega^2}{4D} \longrightarrow t_{c0} = \frac{\omega_0^2}{4D}, \\ tc &= t_{c0} \left[1 + \left(\frac{z}{z_0} \right)^2 \right], \end{aligned}$$

onde D é a difusividade térmica da amostra, temos que

$$\frac{I(z,0)}{I(z,t)} - 1 = \frac{\theta}{\left[1 + \frac{t_{c0}}{2t} (1 + (z/z_0)^2)\right]} \left[\frac{2(z/z_0)}{1 + (z/z_0)^2} \right] + \frac{\theta^2}{\left[1 + \frac{t_{c0}}{2t} (1 + (z/z_0)^2)\right]^2} \left[\frac{1}{1 + (z/z_0)^2} \right].$$

A equação da intensidade do feixe dependente da posição z e do tempo t fica:

$$I(z,t) = \left\{ 1 + \frac{\theta}{\left[1 + \frac{t_{c0}}{2t}(1 + (z/z_0)^2)\right]} \left[\frac{2(z/z_0)}{1 + (z/z_0)^2} \right] + \frac{\theta^2}{\left[1 + \frac{t_{c0}}{2t}(1 + (z/z_0)^2)\right]^2} \left[\frac{1}{1 + (z/z_0)^2} \right] \right\}^{-1}. \quad (\text{A.65})$$

B

Caracterização do feixe de laser utilizado no arranjo de Varredura-Z

A montagem do arranjo experimental da técnica de ZS requer alguns cuidados: É necessário verificar o alinhamento, o perfil gaussiano do feixe e sua circularidade. Apesar do laser utilizado gerar o feixe com perfil gaussiano, o mau alinhamento dos elementos ópticos pode criar distorções que o deixam assimétrico. Esses parâmetros são verificados com uma câmera CCD de Silício (*Coherent*) conectada ao microcomputador e o programa *BeamView USB*, versão 4.4.0 da mesma empresa. A câmera faz a leitura da intensidade do feixe no plano XY , que é o plano no qual podemos observar o perfil gaussiano do feixe.

A figura B.1 mostra o perfil do feixe utilizado. A variação de cores está relacionada à intensidade do feixe.

Figura B.1: Perfil gaussiano e circularidade do feixe utilizado nas medidas de ZS com potência de 120 mW na região de posicionamento da amostra. Arranjo experimental sem filtro espacial.

A circularidade do feixe variou entre 0,94 e 0,85. Foi verificada a opção de se colocar um filtro espacial no arranjo para que o mesmo ficasse mais circular (figura B.2). Com o filtro, o perfil circular do feixe melhora (chegando a 0,98), deixando mais precisas as determinações de z_0 e ω_0 . Porém, por causa da potência utilizada, ocorre a formação de lente térmica nos elementos ópticos do arranjo. Além disso, o alinhamento do arranjo experimental, com o filtro espacial, torna-se mais frequente.

Foi decidido então verificar as curvas de ZS com e sem filtro espacial para um filme de silício amorfo (Si-a) utilizado como padrão no laboratório e para uma amostra de LDL. Uma segunda linha (linha 2) de ZS, sem filtro espacial, foi montada ao lado da primeira (linha 1). Foi tomado o cuidado de se utilizar elementos ópticos iguais nas duas linhas. O valor de z_0 das duas linhas foi determinado utilizando-se a câmera CCD. A linha 1

Figura B.2: Perfil circular do feixe com o filtro espacial posicionado no arranjo experimental.

apresentou $z_0 = 3,28 \pm 0,03$ mm enquanto a linha 2 apresentou $z_0 = 3,23 \pm 0,03$ mm.

As curvas de ZS obtidas podem ser observadas para o filme de Si-a nas duas linhas são apresentadas na figura B.3. É possível observar que a circularidade do feixe teve pouca influência na forma da curva. Aos dados das duas linhas foi ajustada a equação 2.5, tendo sido obtidos os valores de difusividade do mesmo filme em cada uma das linhas. Na linha 1 obteve-se $D = 2,10 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$. Já para a linha 2 o valor obtido foi $D = 1,90 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Foi realizado então um teste nas duas linhas (com e sem filtro espacial) com uma amostra de LDL. As curvas obtidas, apresentadas na figura B.4, são bastante similares, indicando que há pouca influência da circularidade do feixe. Os valores de difusividade térmica obtidos foram $D = (6.1 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ na linha 1 e $D = (6.7 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ na linha 2.

A partir dos resultados apresentados foi definido que a utilização do filtro espacial traria mais inconvenientes do que benefícios, optando-se por trabalhar com o arranjo como

Figura B.3: Curvas de ZS de um filme de Si-a obtida com (linha 1) e sem (linha 2) o filtro espacial posicionado no arranjo experimental. Figura gentilmente cedida por Daniel H.G. Espinosa.

Figura B.4: Curvas de ZS de uma amostra de LDL com (linha 1) e sem (linha 2) o filtro espacial posicionado no arranjo experimental.

apresentado na figura 2.4, sem filtro espacial.

Para determinar o z_0 de um determinado arranjo experimental com a câmera CCD, são tomados dados como os das figuras B.1 e B.2 em diversas posições z do arranjo. Anota-se os valores de raio máximo (ω_{max}) e raio mínimo (ω_{min}) em cada uma delas. Com posse dos valores de raios e as respectivas posições é feito um gráfico de z^2 contra $\omega_{max}^2(z)$ e outro de z^2 contra $\omega_{min}^2(z)$.

Substituindo a relação A.58 na equação A.59 temos:

$$\omega^2(z) = \frac{z_0 \lambda}{\pi} + \frac{\pi z^2}{\lambda z_0}. \quad (\text{B.1})$$

Esta função linear é ajustada aos dados de cada um dos gráficos. Porém como λ é uma característica do arranjo conhecida, z_0 é o único parâmetro de ajuste. Como foram feitos dois gráficos (um com ω_{max} e outro com ω_{min}), serão obtidos dois valores de z_0 . O valor final de z_0 será a média dos dois valores de z_0 obtidos com os ajustes. A figura B.5 apresenta o gráfico de ω_{max}^2 em função de z^2 , com o ajuste da função B.1.

Figura B.5: Dados do raio do feixe em função da posição com ajuste da equação B.1. Neste caso $z_0 = 4,55 \pm 0,03$ mm.

Presença do cobre nas amostras de LDL: condição necessária porém não suficiente

Para certificar-nos de que a simples adição da solução de CuSO_4 não é responsável pela diminuição no sinal observado nas medidas de ZS com as amostras de oxLDL, foi realizado um experimento com três alíquotas de LDL (todas separadas de uma mesma “amostra mãe”). À primeira amostra, que será chamada de “nativa”, foi adicionada a solução de EDTA (utilizada com o objetivo de parar os processos de oxidação *in vitro*). Esta amostra foi armazenada na geladeira, protegida da luz, até que as outras estivessem prontas. À segunda amostra, que será chamada de “oxidada”, foi realizado o procedimento padrão de

oxidação por 90 minutos, descrito na subseção 2.3.2. Em poucas palavras: após a separação é adicionada à amostra uma solução com CuSO_4 . A solução LDL+ CuSO_4 é colocada na estufa por 90 minutos e em seguida é adicionada a solução de EDTA com o objetivo de parar a oxidação. À terceira amostra, que será chamada de “quelada”, foi adicionada a solução de EDTA, homogeneizada, e, logo em seguida, adicionada a solução de CuSO_4 . A amostra foi mantida na estufa por 90 minutos, assim como a amostra oxidada.

Figura C.1: Curvas de ZS de uma amostra de LDL com (linha 1) e sem (linha 2) o filtro espacial posicionado no arranjo experimental.

Após este procedimento, foram realizadas medidas de ZS das três amostras (figura C.1). É fácil observar que a amostra nativa e a amostra quelada têm, aproximadamente, a mesma amplitude pico-vale. Os valores de difusividade térmica, obtidos com os ajustes da equação 2.5 aos dados de ZS, das amostras nativa e quelada são compatíveis entre si dentro de uma incerteza, conforme apresentado na tabela C.1. Já o valor obtido para a amostra de LDL oxidada por 90 minutos tem sua incerteza maior do que o próprio valor,

mostrando que a técnica não é capaz de medir o sinal de transmitância não-linear desta amostra (como esperado).

Tabela C.1: Tabela com os valores de difusividade térmica obtidos nos ajustes da equação 2.5 aos dados experimentais de ZS das amostras de LDL nativa, quelada e oxidada.

Amostra	D (cm ² /s)
nativa	$0,00747 \pm 0,00017$
quelada	$0,00709 \pm 0,00023$
oxidada	$8 \times 10^6 \pm 4 \times 10^7$

Os resultados apresentados comprovam que a simples adição da solução de CuSO₄ não muda o sinal não-linear das amostras de LDL. Para tanto é necessário que haja a oxidação da amostra.

Referências Bibliográficas

- [1] S. Frank, G. Kostner, *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*, 1^a edição, InTech (2012);
- [2] L. Stryer, *Bioquímica*, 4^a edição, Guanabara Koogan (1996);
- [3] S. Eisenberg, *Lipoproteins and Lipoprotein Metabolism*, klin Wochenschr **61**, 119-132 (1983);
- [4] H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jürgens, *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*, Free Radic. Biol. Med. **13**, 341-390 (1992);
- [5] L. Camont, M.J. Chapman, A. Kontush, *Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease*, Trends in Molec. Med. **17**, 594-603 (2011);
- [6] <http://www2.uah.es/mapa/seminarios/activos/U.Mayores/Lipoproteinas/images/LDL.jpg.jpg>
- [7] R.M. Krauss, D.J. Burke, *Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans*, J. of Lipid Res. **23**, 97-104 (1982);
- [8] J.R. Nofer, B. Kehrel, M. Fobker, B. Levkau, G. Assmann, A. von Eckardstein, *HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport*, Atherosclerosis **161**, 1-16 (2002);
- [9] P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis*, Nature **420**, 868-874 (2002);
- [10] I. Levitan, S. Volkov, P.V. Subbaiah, *Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology*, Antioxidants & Redox Signaling **13**(1), 39-75 (2010);

- [11] P. Libby, P.M. Ridker, G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*, Nature **473**, 317-325 (2011);
- [12] Organização Mundial de Saúde:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>;
- [13] J.P. Andrade et al., *VI diretrizes brasileiras de hipertensão*, Arq. Bras. Cardiol. **95**, 1-51 (2010);
- [14] O. Hasselwander, J McEneny, D. McMaster, D.G. Fogarty, D.P. Nicholls, A.P. Maxwell, I.S. Young, *HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis*, Atherosclerosis **143**, 125-133 (1999);
- [15] D. Steinberg, S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo, J.L. Witztum, *Beyond Cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*, New Engl. J. Med. **320**(14), 915-924 (1989);
- [16] S.L. Gómez, R.F. Turchiello, M.C. Jurado, P. Boschcov, M. Gidlund, A.M. Figueiredo Neto, *Characterization of native and oxidized human low-density lipoproteins by the Z-scan technique*, Chem. and Phys. Lipids **132**, 185-195 (2004);
- [17] S.L. Gómez, A.M. Monteiro, S.R. Rabbani, A.C. Bloise, S.M. Carneiro, S. Alves, M. Gidlund, D.S.P. Abdalla, A.M. Figueiredo Neto, *Cu and Fe metallic ions-mediated oxidation of low-density lipoproteins studied by MNR, TEM and Z-scan technique*, Chem. and Phys. Lipids **163**, 545-551 (2010);
- [18] A.M. Monteiro, M.A. Jardini, S. Alves, V. Giampaoli, E.C. Aubin, A.M. Figueiredo Neto, M. Gidlund, *Cardiovascular disease parameters in periodontitis*, J. Periodontol. **80**, 378-388 (2009);
- [19] A.M. Monteiro, M.A. Jardini, V. Giampaoli, S. Alves, A.M. Figueiredo Neto, M. Gidlund, *Measurement of the nonlinear optical response of low-density lipoprotein solutions from patients with periodontitis before and after periodontal treatment: evaluation of cardiovascular risk markers*, J. Biomed. Opt. **17**, 115004 (2012);
- [20] M. Sheik-Bahae, A.A. Said, E.W. Van Stryland, *High-sensitive, single beam n_2 measurements*, Opt. Lett. **14**(17), 955-957 (1989);
- [21] M. Sheik-Bahae, A.A. Said, T.W. Wei, D.J. Hagan, E.W. Van Stryland, *Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam*, IEEE J. Quantum Elect. **26**(4), 760-769 (1990);

- [22] A.A. Said, M. Sheik-Bahae, D.J. Hagan, T.W. Wei, J. Wang, J. Young, E.W. Van Stryland, *Determination of bound-electronic and free-carrier nonlinearities in ZnSe, GaAs, CdTe, and ZnTe*, J. Opt. Soc. Am. B **9**(3), 405-414 (1992);
- [23] B. Yu, C. Zhu, F. Gan, *Optical nonlinearity of Bi₂O₃ nanoparticles studied by Z-scan technique*, J. Appl. Phys. **82**(9), 4532-4537 (1997);
- [24] L. Irimpan, B. Krishnan, V.P.N. Nampoori, P. Radhakrishnan, *Linear and nonlinear optical characteristics of ZnO-SiO₂ nanocomposites*, Appl. Opt. **47**(24), 4345-4351 (2008);
- [25] T. Kaplas, L. Karvonen, J. Rönn, M.R. Saleem, S. Kujala, S. Honkanen, Y. Svirko, *Nonlinear refraction in semitransparent pyrolytic carbon films*, Opt. Mat. Express **2**(12), 1822-1827 (2012);
- [26] S.H. Chi, A. Rosenberg, A. Nayak, T.V. Duncan, M.J. Therien, J.J. Butler, S.R. Montgomery, G. Beadie, R.G.S. Pong, J.S. Shirk, S.R. Flom, *Near IR nonlinear absorption of an organic supermolecule*, Opt. Mat. Express **1**(7), 1383-1392 (2011);
- [27] P.J. Gordon, R.C.C. Leite, R.S. Moore, S.P.S. Porto, J.R. Whinnery, *Long-Transient effects in lasers with inserted liquid samples*, J. Appl. Phys. **36**(1), 3-8 (1965);
- [28] J.R. Whinnery, *Laser measurement of optical absorption in liquids*, Acc. Chem. Res. **7**, 225-231 (1974);
- [29] C.A. Carter and J.M. Harris, *Comparison of models describing the thermal lens effect*, Appl. Opt. **23**(3), 476-481 (1984);
- [30] M. Franko, C.D. Tran, *Thermal lens technique for sensitive kinetic determinations chemical reactions. Part I. Theory*, Rev. Sci. Instrum. **62**(10), 2430-2437 (1991);
- [31] R. Rusconi, E. Rodari, R. Piazza, *Optical measurements of the thermal properties of nanofluids*, Appl. Phys. Lett. **89**, 261916 (2006);
- [32] R. Karimzadeh, N. Mansour, *Thermo-optic nonlinear response of silver nanoparticle colloids under a low power laser irradiation at 532 nm*, Phys. Status Solidi B **247**(2), 365-370 (2010);
- [33] S. Vasudevan, G.C.K. Chen, M. Andika, *Application of thermal lens response to monitor health status of red blood cells: a quantitative study of the cell death process by extracting thermal diffusivity and size*, Appl. Phys. Lett. **96**(11), 113703 (2010);

- [34] D. Lapotko, A. Shnip, E. Lukianova, *Photothermal responses of individual cells*, J. Biomed. Opt. **10**(1), 014006 (2005);
- [35] R.J. Havel, H.A. Eder, J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*, J. Clin. Int **9**, 1345-1353 (1955);
- [36] E.C. Fernvik, D.F.J. Ketelhuth, M. Russo, M. Gidlund, *The autoantibody repertoire against copper- or macrophage-modified LDL differs in normolipidemics and hypercholesterolemic patients*, J. Clin. Immunol. **24**(2), 170-176 (2004);
- [37] E.G. Bligh e W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*, Can. J. Biochem. Physiol. **37**(8), 911-917 (1959);
- [38] L.J. Hatam e H.J. Kayden, *A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood*, J. Lipid Res. **20**(5), 639-645 (1979);
- [39] G.S. Ginsburg, D.M. Small, D. Atkinson, *Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters*, The Journal of Biological Chemistry **257**, 8216-8227 (1982);
- [40] D.R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, 79ª edição, CRC Press (1998);
- [41] A.W. Girotti, *Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action*, Free Radic. Biol. Med. **44**(6), 956-968 (2008);
- [42] <http://www.lnls.br/sLista-178/SAXS-1-e-SAXS-2.aspx>;
- [43] C.L.P. Oliveira, *Current Trends in X-Ray Crystallography*, Capítulo 16, 1ª edição, InTech (2011);
- [44] P. Laggner, K. Muller, O. Kratky, *Studies on the structure of lipoprotein A of human high density lipoprotein HDL₃: The spherically averaged electron density distribution*, FEBS Lett. **33**(1), 77-80 (1973);
- [45] D. Atkinson, R.J. Deckelbaum, D.M. Small, G.G. Shipley, *Structure of human plasma low-density lipoproteins: Molecular organization of the central core*, PNAS **74**(3), 1042 - 1046 (1977);
- [46] P. Laggner, K. W. Muller, O. Kratky, *X-ray small angle scattering on human plasma lipoproteins*, J. Colloid Interface Sci. **55**(1), 102-108 (1976);

- [47] D.F. Meyer, A.S. Nealis, C.H. MacPhee, P.H.E. Groot, K.E. Suckling, K.R. Bruckdorfer, S.J. Perkins, *Time-course studies by synchrotron X-ray solution scattering of the structure of human low-density lipoprotein during Cu²⁺-induced oxidation in relation to changes in lipid composition*, Biochem J. **319**, 217-227 (1996);
- [48] Y. Liu, D. Luo, D. Atkinson, *Human LDL core cholesterol ester packing: three-dimensional image reconstruction and SAXS simulation studies*, J. of Lipid Res. **52**, 256-262 (2011);
- [49] R. Prassl, *Human low density lipoprotein: the mystery of core lipid packing*, J. of Lipid Res. **52**, 187-188 (2011);
- [50] R. Prassl, P. Laggner, *Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges*, Eur. Biophys. J. **38**, 145-158 (2009);
- [51] G. Ren, G. Rudenko, S.J. Ludtke, J. Deisenhofer, W. Chiu, H.J. Pownall, *Model of human low-density lipoprotein and bound receptor based on CryoEM*, PNAS **107**, 1059-1064 (2010);
- [52] C.L.P. Oliveira, B.B. Gerbelli, E.R.T. Silva, F. Nallet, L. Navailles, E.A. Oliveira, J.S. Pedersen, *Gaussian deconvolution: a useful method for a form-free modeling of scattering data from mono- and multilayered planar systems*, Journal of Applied Crystallography **45**, 1278-1286 (2012);
- [53] C. Oliveira, M.A. Behrens, J.S. Pedersen, K. Erlacher, D. Otzen, J.S. Pedersen, *A SAXS Study of Glucagon Fibrillation*, Journal of Molecular Biology **387**(1), 147-161 (2009);
- [54] O. Glater, O. Kratky, *Small angle X-ray scattering*, Academic Press (1982);
- [55] L.A. Feigin, D.I. Svergun, *Structure analysis by small angle X-ray and neutron scattering*, Plenum Press (1987);
- [56] M. Kotlarchyk, S. H. Chen, *Analysis of Small-Angle Neutron-Scattering Spectra from Polydisperse Interacting Colloids*, J. of Chem. Phys. **79**(5), 2461-2469 (1983);
- [57] A. Bergmann, G. Fritz, O. Glatter, *Solving the generalized indirect Fourier transformation (GIFT) by Boltzmann simplex simulated annealing (BSSA)*, Journal of Applied Crystallography **33**, 1212-1216 (2000);

- [58] J. Teixeira, *Small-angle scattering by fractal systems*, Journal of Applied Crystallography **21**, 781-785 (1988);
- [59] C. Oliveira, *Investigating Macromolecular Complexes in Solution by Small Angle X-Ray Scattering*, Current Trends in X-Ray Crystallography. D. A. Chandrasekaran, InTech, 367-392 (2011);
- [60] O. Glatter and B. Hainisch, *Improvements in Real-Space Deconvolution of Small-Angle Scattering Data*, Journal of Applied Crystallography **17**, 435-441 (1984);
- [61] C. Oliveira and J. Pedersen, em preparação;
- [62] P. Debye, *X-ray dispersal*, Annalen Der Physik **46**(6), 809-823 (1915);
- [63] P. Lindner e T. Zemb, *Neutrons X-ray and light: scattering methods applied to soft condensed matter*, Elsevier, Amsterdam (2002);
- [64] G. Kellermann, F. Vicentin, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievich, I. Torriani, *The Small-Angle X-ray Scattering Beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory*, Journal of Applied Crystallography **30**, 880-883 (1997);
- [65] L.P. Cavalcanti, I.L. Torriani, T.S. Plivelic, C.L.P. Oliveira, G. Kellermann, R. Neuenschwander, *Two new sealed sample cells for small angle X-ray scattering from macromolecules in solution and complex fluids using synchrotron radiation*, Review of Scientific Instruments **75**, 4541-4546 (2004);
- [66] <http://web.if.usp.br/cristal/node/103>;
- [67] E.V. Orlova, M.B. Sherman, W. Chiu, H. Mowri, L.C. Smith, A.M. Gotto Jr., *Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy*, PNAS **95**, 8420-8425 (1999);
- [68] S. Singh, R. Suri, C.G. Agrawal, *Fluorescence propoertier of oxidised human plasma low-density lipoproteins*, Biochimica et Biophysica Acta **1254**, 135-139 (1995);
- [69] R. Prassl, B. Schuster, P. Laggnier, C. Flamant, F. Nigon, M.J. Champman, *Thermal stability of Apolipoprotein B100 in low-density lipoprotein is disrupted at early stages of oxidation while neutral lipid core organization is conserved*, Biochemistry **37**, 938-944 (1998);

- [70] L.G.B. Bremer, L. Deriemaeker, R. Finsy, E. Geladé, J.G.H. Joosten, *Fiber Optics Dynamic Light Scattering, neither Homodyne nor Heterodyne*, Langmuir **9**(8), 2008-2013 (1993);
- [71] H. S. Carslaw e J.C. Jaeger, *Operational Methods in Applied Mathematics*, p. 106-110, Dover Publications, EUA (1963);
- [72] M. Born e E. Wolf, *Principles of Optics*, p. 123 - 124, Pergamon Press (1980);
- [73] J.M. Harris e J. Dovichi, *Thermal Lens Calorimetry*, Analytical Chemistry **52**, 695A-706A (1980);
- [74] M. Born e E. Wolf, *Principles of Optics*, p. 110 - 112, Pergamon Press (1980).

Lista de abreviaturas

Apo-B100 – Apolipoproteína B100
ChOOH – Hidroperóxidos de colesterol
CuSO₄ – Sulfato de cobre II
DLS – Espalhamento dinâmico de luz
GIFT – Generalização da transformada de Fourier inversa
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HPLC – Cromatografia Líquida de alta performance
IFT – Transformada de Fourier inversa
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LOOH – Hidroperóxidos de lipídio
LT – Modelo de Lente Térmica
PDDF – Função distribuição de distância entre pares
PLOOH – Hidroperóxidos de fosfolipídio
SAXS – Espalhamento de raios X a baixos ângulos
ZS – Varredura-Z

Lista de Figuras

1.1	Figura esquemática da estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL), adaptada de [6].	3
1.2	Figura esquemática de uma artéria sadia e de uma artéria com aterosclerose. Artérias humanas de adultos saudáveis têm diâmetro tipicamente entre 1 e 10 mm.	5
1.3	Fases de oxidação da LDL e de produtos de oxidação formados em função do tempo de oxidação <i>in vitro</i> . Figura adaptada de [4].	6
2.1	Desenho esquemático do arranjo proposto por Sheik-Bahae e colaboradores [20].	10
2.2	Exemplo de uma amostra com $dn/dT < 0$. Neste caso, a amostra se comporta como uma lente divergente. As linhas tracejadas mostram a abertura do feixe sem a ação da amostra.	11
2.3	Exemplo de curva de transmitância normalizada em função da posição da amostra. A curva vermelha representa o caso de uma amostra que se comporta como uma lente divergente ($dn/dT < 0$) e a curva azul, o caso de uma amostra que se comporta como uma lente convergente ($dn/dT > 0$).	12
2.4	Figura esquemática do arranjo experimental de ZS.	20
2.5	As figuras a , b e c são gráficos de intensidade de luz transmitida em função do tempo. Na figura a é possível observar um pulso transmitido com a amostra posicionada longe da cintura do feixe (no caso, $z = -45 \text{ mm}$). Nas figuras b e c podemos observar pulsos de luz transmitidos com a amostra posicionada próxima à cintura do feixe, $z = -7 \text{ mm}$ e $z = 6 \text{ mm}$, respectivamente. Por termos um aumento da intensidade de luz transmitida antes do foco e uma diminuição após, inferimos que esta é uma amostra com $dn/dT < 0$	23

2.6	a) Curva média típica da dependência temporal da transmitância normalizada da amostra de naLDL em $z = +15$ mm (vermelha) e $z = -15$ mm (azul). O foco está em $z = 0$ mm. b) Curvas médias da dependência espacial da transmitância normalizada das amostras naLDL, 60 minutos oxLDL e 90 minutos oxLDL. Nos dois gráficos as linhas contínuas são os ajustes iterativos obtidos com a equação 2.5.	31
2.7	Parâmetro θ (ajustado por meio da equação 2.2 e normalizado pela potência incidente do laser) em função do tempo de oxidação <i>in vitro</i> das partículas de LDL. As barras de erro dos valores de θ ajustados foram estimadas apenas a partir dos ajustes e não levam em conta outras possíveis fontes de erro. Elas não aparecem por serem menores do que os pontos.	32
2.8	Parâmetro t_{c_0} (obtido através do ajuste da equação 2.2) em função do tempo de oxidação <i>in vitro</i> das amostras de LDL.	33
2.9	Comparação entre o sinal óptico não-linear de uma amostra de LDL total (em vermelho) e dos antioxidantes isolados da mesma amostra (em azul). .	34
2.10	Resposta óptica não-linear da LDE medida em arranjo de ZS, com luz de 532 nm, para diferentes potências incidentes.	35
2.11	Curvas médias da dependência espacial da transmitância normalizada das amostras naHDL, oxHDL-30min e oxHDL-18h. As linhas contínuas são os ajustes iterativos obtidos com a equação 2.2.	36
2.12	Valores de θ obtidos nos ajustes das curvas de ZS das amostras de HDL nativa e oxidadas através da equação 2.2.	37
2.13	Espectro de absorção linear de amostras com soluções contendo LDE em diversas concentrações. A linha vertical azul marca $\lambda = 532$ nm, que é o comprimento de onda usado nos experimentos de ZS.	38
2.14	Espectro de absorção linear de soluções contendo LDL em função do tempo de oxidação <i>in vitro</i> . A linha vertical azul marca $\lambda = 532$ nm, que é o comprimento de onda usado nos experimentos de ZS.	38
2.15	Coefficiente de absorção linear em 532 nm em função do tempo de oxidação <i>in vitro</i> das amostras de LDL. As incertezas apresentadas estão relacionadas apenas à dispersão nas medidas, não levando em conta outras fontes de erro. .	39
2.16	Espectro de absorção linear de soluções contendo HDL em função do tempo de oxidação <i>in vitro</i> . A linha vertical azul marca $\lambda = 532$ nm, que é o comprimento de onda usado nos experimentos de ZS.	40

2.17	Coeficiente de absorção linear em 532 nm em função do tempo de oxidação <i>in vitro</i> das amostras de HDL.	41
2.18	Gráfico típico de um ajuste linear dos dados obtidos nas medidas de calorimetria. A reta ajustada foi $Pt(T) = (3,482 \pm 0,003)T - (1756,38 \pm 0,26)$. As barras de erro experimental não aparecem por serem menores do que o tamanho dos pontos.	42
2.19	Gráfico com os valores médios de c_v em função do tempo de oxidação. . . .	42
2.20	Gráfico típico de um ajuste linear dos dados obtidos nas medidas de dn/dT . A reta ajustada foi $n(T) = (-1,29 \pm 0,11) \times 10^{-4}T + (1,3375 \pm 0,0004)$. . .	43
2.21	Valores de dn/dT obtidos através do ajuste linear das seguintes medidas realizadas: duas com LDL nativa e duas com LDL oxidada <i>in vitro</i> por 90 minutos.	44
2.22	Valores de densidade das soluções de LDL em função do tempo de oxidação. .	44
2.23	Consumo do conteúdo de antioxidantes das LDLs em função do tempo de oxidação das amostras.	45
2.24	Produção de hidroperóxidos de colesterol e de fosfolipídios em função do tempo de oxidação das amostras.	46
2.25	Parâmetro θ (ajustado pela equação 2.2), normalizado pela potência (P) incidente do laser e pela absorvância decádica (A), em função do tempo de oxidação de cada amostra.	48
2.26	Valores de D obtidos através do ajuste da equação 2.5 aos dados de ZS, em função do tempo de oxidação.	49
2.27	Comparação entre o consumo relativo de caroteóides e a diminuição relativa no sinal de absorção linear das amostras de LDL em função do tempo de oxidação.	51
3.1	Desenho esquemático do arranjo de espalhamento de raios X.	55
3.2	Relação entre o feixe incidente, o feixe espalhado e o vetor de espalhamento ($\vec{q}$).	56
3.3	Figura esquemática da relação entre a função de espalhamento, $I(q)$, e a função distribuição de distância entre pares.	57
3.4	Figura esquemática da distribuição $p(r)$. Neste exemplo, a amplitude da função para o valor de $r = 25$ (unidades arbitrárias) é proporcional à quantidade de segmentos de tamanho 25 (unidades arbitrárias) que cabem na partícula de tamanho 75 (unidades arbitrárias).	58

3.5	Desenho esquemático do modelo utilizado na descrição da densidade eletrônica das lipoproteínas. R_{max} é o raio máximo da partícula e ε é sua anisotropia. Assim, se $\varepsilon = 1$ a partícula é esférica, se $\varepsilon < 1$ temos um esferóide oblato e se $\varepsilon > 1$ a partícula tem forma de um esferóide prolato.	65
3.6	Ajuste dos dados da amostra de LDL oxidada com cobre por 5 minutos explicitando as componentes dos ajustes do método GIFT e da deconvolução quadrática.	67
3.7	Desenho esquemático do arranjo experimental da linha SAXS1 do LNLS. (1) sistema de colimação, (2) espelho para focalização vertical do feixe, (3) monocromador, (4) porta-amostras e (5) detectores. As medidas das dimensões são dadas em mm. Figura adaptada de [64].	70
3.8	Desenho esquemático do arranjo experimental da linha do Nanostar localizada no Laboratório de Cristalografia do IF-USP. (1) fonte de raios X, (2) sistema de colimação, (3) sistema de fendas, (4) porta-amostras e (5) detector 2D.	71
3.9	Ajuste das funções aos resultados experimentais das amostras de LDL nativa e oxidadas <i>in vitro</i> com cobre por diferentes intervalos de tempo.	72
3.10	Distribuição $p(r)$ obtida através do método IFT ajustado aos dados das amostras de oxLDL com diferentes graus de oxidação.	73
3.11	Raio médio obtido com o método IFT para as amostras de oxLDL.	74
3.12	Ajuste da curva de espalhamento inteira (curva em rosa) e do fator de forma (curva verde) aos resultados experimentais de $I(q)$ das amostras de LDL oxidadas <i>in vitro</i> com CuSO_4	75
3.13	Distribuições $p(r)$ obtidas através do ajuste com o método GIFT aos resultados experimentais das amostras de LDL nativa e oxidadas <i>in vitro</i> com CuSO_4	76
3.14	a) Evolução do raio dos agregados de LDL em função do tempo de oxidação da amostra. b) Evolução da contribuição média de monômeros e agregados para o sinal de intensidade de espalhamento em função do tempo de oxidação da amostra. c) Evolução da fração média do número de monômeros e agregados em função do tempo de oxidação da amostra. As incertezas dos ajustes são menores do que o tamanho dos pontos e por isso não aparecem.	78
3.15	Ajustes do fator de forma obtidos com o método de deconvolução quadrática para as amostras de naLDL e oxLDL.	80

3.16	Perfil médio de densidade eletrônica das partículas de LDL em função da distância r ao centro da partícula, em relação à água.	81
3.17	a) Raio médio das partículas em função do tempo de oxidação. A reta representa a média dos seis pontos e vale 155,9 Å. b) Dispersão média do raio das partículas de LDL em função do tempo de oxidação. A reta representa a média da dispersão do raio e vale 14,25 Å.	82
3.18	Evolução do fator de escala S_{c_2} (equação 3.17) em função do tempo de oxidação das amostras. Esse fator estaria associado à quantidade de cadeias flexíveis expostas da ApoB-100.	83
3.19	Ajuste, através do método IFT, aplicado aos resultados experimentais de SAXS das amostras de HDL nativa e oxidadas <i>in vitro</i> com cobre.	84
3.20	Distribuições $p(r)$ obtidas através dos ajustes com o método IFT das amostras de oxHDL com diferentes graus de oxidação.	85
3.21	Valores de raio médio das partículas de HDL calculados através da equação 3.8. A linha contínua representa a média das cinco amostras, que é $45,02 \pm 0,24$ Å.	86
3.22	Ajustes do fator de forma obtidos pelo método de deconvolução quadrática para as amostras de naHDL e oxHDL.	87
3.23	Contraste médio de densidade eletrônica das partículas de HDL em função de r , distância ao centro da partícula.	88
3.24	a) Raio médio das partículas de HDL em função do tempo de oxidação. b) Polidispersão média do raio das partículas de HDL em função do tempo de oxidação.	89
3.25	a) Curvas de autocorrelação experimentais das medidas de DLS das amostras de LDL e respectivos ajustes. b) Distribuição de diâmetros das partículas e aglomerados calculada a partir da fração de volume das amostras.	91
3.26	a) Curvas de autocorrelação experimentais das medidas de DLS das amostras de HDL e respectivos ajustes. b) Distribuição de diâmetros das partículas e aglomerados calculada a partir da fração de volume das amostras.	93
A.1	Desenho esquemático de um feixe passando pela amostra que sofre o efeito da lente térmica. Adaptado de [27].	110
A.2	Esquema da relação entre $d\vec{r}$ e ds	111
A.3	Esquema dos vetores $\vec{s}$ e $\vec{\nu}$. Figura retirada de [72].	114
A.4	Desenho esquemático da relação entre ω_0 , ω_1 e ω_2	118

B.1	Perfil gaussiano e circularidade do feixe utilizado nas medidas de ZS com potência de 120 mW na região de posicionamento da amostra. Arranjo experimental sem filtro espacial.	130
B.2	Perfil circular do feixe com o filtro espacial posicionado no arranjo experimental.	131
B.3	Curvas de ZS de um filme de Si-a obtida com (linha 1) e sem (linha 2) o filtro espacial posicionado no arranjo experimental. Figura gentilmente cedida por Daniel H.G. Espinosa.	132
B.4	Curvas de ZS de uma amostra de LDL com (linha 1) e sem (linha 2) o filtro espacial posicionado no arranjo experimental.	132
B.5	Dados do raio do feixe em função da posição com ajuste da equação B.1. Neste caso $z_0 = 4,55 \pm 0,03$ mm.	133
C.1	Curvas de ZS de uma amostra de LDL com (linha 1) e sem (linha 2) o filtro espacial posicionado no arranjo experimental.	136

Lista de Tabelas

1.1	Classificação e propriedades das lipoproteínas [2,3].	2
2.1	Gradiente da metodologia Bligh e Dyer para quantificação dos ésteres de colesterol, fosfolipídios e os respectivos hidroperóxidos presentes nas amostras de LDL.	28
2.2	Gradiente da metodologia Hatam e Clayden para quantificação dos antioxidantes presentes nas amostras de LDL.	29
2.3	Tabela com os valores médios de c_v , ρ e $-dn/dT$ calculados a partir das medidas de LDL em função do tempo de oxidação. O valor da densidade da água é um valor de referência a $20^\circ C$ e foi obtido através de [40].	47
3.1	Tabela esquemática das medidas de SAXS de lipoproteínas.	68
3.2	Parâmetros do ajuste do método de generalização da transformada de Fourier inversa obtidos para o grupo de amostras oxLDL.	77
3.3	Estimativa de diâmetros médios das amostras de LDL obtidos a partir das distribuições de diâmetros calculadas através da fração de volume.	92
3.4	Estimativa de diâmetros médios obtidos a partir das distribuições de diâmetros calculadas através da fração de volume das amostras de HDL.	94
C.1	Tabela com os valores de difusividade térmica obtidos nos ajustes da equação 2.5 aos dados experimentais de ZS das amostras de LDL nativa, quelada e oxidada.	137