AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Caracterização da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) por Meios Espectroscópicos

Letícia Bonfante Sicchieri

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Lília Coronato Courrol

São Paulo
2012

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais Adevanir Sicchieri e Valda Aparecida Bonfante Sicchieri, ao meu irmão Alexandre Sicchieri, a minha avó Maria Raimundo Bonfante (Vó Cida) e ao meu namorado Leandro Matioli Machado pelo apoio, auxílio e carinho durante todos os momentos da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível.

"Um mundo no qual o tempo é absoluto é um mundo consolador. Pois, embora os movimentos das pessoas sejam imprevisíveis, o movimento do tempo é previsível. Embora se possa duvidar das pessoas, não se pode duvidar do tempo. Enquanto as pessoas ficam divagando, o tempo prossegue em sua caminhada sem olhar para trás."

Autor: Alan Lightman

Livro: Sonhos de Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família, meus pais Adevanir Sicchieri e Valda Ap. Bonfante Sicchieri por toda ajuda e paciência e ao meu irmão Alexandre Sicchieri Neto e a sua noiva Carla Santos pelo apoio e momentos de descontração.

Agradeço a minha orientadora Dra. Lilia Coronato Courrol pelo carinho, atenção, longas conversas e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Leandro Mاتيolli Machado pelo companheirismo, carinho, paciência e momentos de muita felicidade e seus pais pelo apoio e carinho.

As minhas grandes amigas Ana Claudia Ballet de Cara e Debora Aureliano e ao meu grande amigo Renato Ribamar pelas conversas, momentos de descontração.

Ao pessoal da salinha de estudos Matheus Tunes, Danilo Mariano da Silva, Antônio Santos, pelas conversas, risadas e auxílio durante esse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Ricardo Almeida, Rafael e Daliana, pela ajuda e conversas durante a realização desse trabalho.

Ao pessoal do CLA Thiago, Ivanildo, Carolina Benetti, Moisés Santos, Viviane Goulart, Marcelo Noronha Veloso, Paulo Correa, Thiago Pereira pelas conversas na copa e momentos de descontração.

A Dra. Andrea Moreira Monteiro, pelo apoio no desenvolvimento no trabalho, pelas discussões a respeito do tema, pela amizade e carinho e principalmente paciência.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Dr. Antônio Martins Figueiredo Neto por conceder as amostras de frações de colesterol e ao Dr. Magnus A. Gidlund por permitir a utilização de seu laboratório.

Ao Dr. Laércio Gomes e Dr. Amando Suito Ito e ao Dr. Ricardo Elgul Samad pelas preciosas discussões a respeito do trabalho e por permitir a utilização de equipamentos para realização de experimentos apresentados nesse trabalho. Ao Dr. Nilson Vieira pela utilização da infraestrutura do laboratório.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Lipoproteínas	20
3.1.1 Colesterol e classificação das lipoproteínas	20
3.1.2 Lipoproteína de Baixa Densidade	23
3.1.3 Triptofano	24
3.1.4 Processo de oxidação da partícula de LDL	26
3.1.5 Aterosclerose	28
3.1.6 Metodologias de quantificação de LDL	30
3.2. Biossensores	33
3.2.1 Európio-Clorotetraciclina	33
3.2.2 Lantanídeos	33
3.2.3 Európio	34
3.2.4 Tetraciclina	35
3.2.5 Complexo EuCTc	37
3.3 Tioflavina T	39
3.4 Laser de Pulsos Ultracurtos	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Preparação Biomarcadores	49
4.1.1 Complexo EuCTc	49
4.1.2 Interferente	49
4.1.3 Tioflavina T	49
4.2 Protocolo para separação da LDL	50
4.2.1 Oxidação da LDL com íons de Cobre	50

4.2.2 Oxidação da LDL com íons de Ferro.....	50
4.3 Absorção e emissão óptica.....	50
4.4 Tempo de vida íon Európio no complexo EuCTc	51
4.5 Tempo de vida do Triptofano nas amostras de LDL	51
4.6 Anisotropia do Triptofano nas amostras de LDL	52
4.7 Irradiação da LDL com laser de pulsos ultracurtos	53
4.7.1 Irradiação com laser.....	53
4.7.2 Quantificação alfatocoferol.....	54
4.7.3 Peroxidação Lipídica	54
4.7.4 Cromatografia de exclusão molecular ou gel de filtração	55
4.7.5 Eletroforese	55
4.7.6 Microscopia eletrônica de transmissão	55
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Biossensor EuCTc.....	57
5.2 Tioflavina T	71
5.3 Quantificação da LDL diretamente no plasma humano.	78
5.3.1 Biossensor Európio-Clorotetraciclina.....	79
5.3.2 Biossensor – Tioflavina T (ThT)	87
5.4 Irradiação da LDL com laser de pulsos ultracurtos.	92
5.4.1 Estudo do tempo de irradiação com laser	92
5.4.2 Estudo da temperatura das soluções de LDL irradiadas com laser.....	93
5.4.3 Estudo da variação de energia do laser.....	94
5.4.4 Caracterização química das soluções de LDL irradiadas com laser.....	96
5.4.5 Emissão do corante ThT na presença da LDL Nativa, Cu-LDL, Fe-LDL e fs-LDL	105
5.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão das partículas de LDL.....	105
5.4.7 Estudos da fluorescência do triptofano nas amostras de LDL modificada.....	108

6. CONCLUSÕES	114
7.PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS.....	116
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do colesterol [17].....	20
Figura 2- Distribuição da densidade e tamanho das lipoproteínas. [18].....	21
Figura 3- Estrutura da lipoproteína de baixa densidade. [25].....	24
Figura 4 - Estrutura básica de um aminoácido primário[17].	25
Figura 5 - Estrutura molecular do triptofano [17].....	26
Figura 6 - Mecanismo da oxidação da LDL <i>in vivo</i> . [3].....	27
Figura 7 - Etapas da peroxidação lipídica [40].	28
Figura 8- Eventos iniciais à formação da placa de aterosclerose [53].....	30
Figura 9- Tabela Periódica mostrando os íons lantanídeos.	33
Figura 10- Diagrama de níveis de energia do íon Eu^{+3} . [74].....	35
Figura 11 - Estrutura da Clorotetraciclina [76].....	35
Figura 12- Estrutura da Tetraciclina e de seus derivados	36
Figura 13 - Diagrama de Jablonski do complexo EuCTc . [81]	38
Figura 14 - Estrutura Tioflavina T. [88]	40
Figura 15- Esquema qualitativo do estado fundamental e estado excitado em TC [92].	41
Figura 16 - Dependência do nível fundamental com relação aos ângulos (A) Energia de superfície $E_{s0}(\phi, \psi, \omega_0)$ vs. ϕ, ψ (B) Dependência energética do ângulo ϕ (ψ pode variar) (C) Dependência energética no ângulo ψ (ϕ pode variar). Os cálculos foram obtidos a partir do método AMI. [89].	42
Figura 17 - Energias do Estado Fundamental e Estado Excitado da ThT em função do ângulo de torção ϕ [91].....	43

Figura 18 - Esquema da desexcitação da molécula de Tiflavina T. [90].....	44
Figura 19 - Módulos básicos de um sistema CPA. [104]	46
Figura 20 - Irradiação da solução de LDL com laser de pulsos ultracurtos.	53
Figura 21 - Espectro de absorção da clorotetraciclina, do complexo EuCTc e do complexo EuCTc na presença da LDL Nativa.	57
Figura 22 - Espectro de emissão do complexo EuCTc com diferentes razões molares na presença da LDL Nativa.	58
Figura 23 - Espectro Emissão EuCTc:LDL (diferentes diálises).	59
Figura 24 - Espectro de emissão do complexo EuCTc com e sem PBS.....	60
Figura 25 - Emissão do EuCTc:LDL Nativa.	61
Figura 26 - Curva de calibração EuCTc:LDL nativa.....	61
Figura 27 - Espectro de emissão do EuCT:FeLDL.....	63
Figura 28 - Curva de calibração EuCTc:FeLDL.	63
Figura 29 - Espectro de emissão EuCTc:CuLDL.	64
Figura 30 - Curva de calibração EuCTc:CuLDL.....	65
Figura 31 - Espectro de emissão EuCTcCa:CuLDL.....	66
Figura 32 - Curva de calibração EuCTcCa:CuLDL.	66
Figura 33 - Tempo de vida do íon Európio na presença de diferentes concentrações de LDL.....	68
Figura 34 - Tempo de vida do íon Európio na presença de diferentes concentrações de CuLDL.	69
Figura 35- Espectro de emissão ThT:LDL nativa.	72
Figura 36 - Curva de calibração ThT:LDL Nativa.	73
Figura 37 - Espectro de emissão da ThT:CuLDL.....	74
Figura 38 - Curva de calibração ThT:CuLDL.	74
Figura 39 - Comparação curvas de calibração ThT:LDL nativa e ThT:CuLDL.	75

Figura 40 - Espectro de emissão da ThT:FeLDL.	76
Figura 41 - Curva de calibração ThT:FeLDL.	77
Figura 42 - Espectro de absorção do complexo EuCTcMg na presença do Plasma Humano.	80
Figura 43- Espectro de emissão do complexo EuCTcMg na presença do plasma humano.	80
Figura 44 - Curva de calibração da emissão da Clorotetraciclina no complexo EuCTcMg na presença do plasma humano.	81
Figura 45 - Espectro de absorção do complexo EuCTc na presença do plasma humano.	82
Figura 46 - Espectro de emissão do complexo EuCTc na presença do plasma humano.	83
Figura 47 - Espectro de absorção da clorotetraciclina na presença do plasma humano, com e sem o íon interfere.	84
Figura 48 - Espectro de emissão da CTc na presença do plasma.	84
Figura 49 - Espectro de absorção do complexo EuCTcMg na presença da LDL.....	85
Figura 50 - Espectro de emissão do complexo EuCTcMg na presença de diferentes concentrações de LDL.	86
Figura 51- Curva de calibração do complexo EuCTcMg na presença da LDL.....	87
Figura 52 - Espectro de absorção da Tioflavina T na presença do plasma humano.....	88
Figura 53 - Espectro de emissão da ThT na presença de diferentes quantidades de plasma.	88
Figura 54 - Curva de calibração ThT na presença do plasma humano.....	89
Figura 55 - Espectro de absorção da ThT na presença da LDL.....	90
Figura 56 - Espectro de emissão da ThT na presença da LDL.	90
Figura 57 - Curva de calibração da ThT na presença da LDL.....	91
Figura 58 - Soluções de LDL após irradiação	92
Figura 59 - Absorção das soluções de LDL irradiadas com diferentes tempos.....	93
Figura 60 - Absorção das soluções de LDL irradiadas com diferentes energias.....	94

Figura 61 - Área integrada da absorção do beta-caroteno para diferentes energias de irradiação. A curva foi ajustada pela função de Boltzmann: $y = A2 + (A1-A2)/[1.\exp((x-x0)/p)]$, $A1 = 2621,34 \pm 53,73$, $A2 = 1916,69 \pm 60,87$, $x0 = 388,13 \pm 26,82$ e $p = 74,56 \pm 23,70$.	95
Figura 62 - Concentração de alfatocoferol presente nas partículas de LDL irradiadas com diferentes energias. A curva foi ajustada pela função de Boltzmann. $y = A2 + (A1-A2)/[1.\exp((x-x0)/p)]$, com $A1 = 119,85 \pm 0,61$, $A2 = 101,24 \pm 0,51$, $x0 = 351,86 \pm 8,04$ e $p = 34,85 \pm 5,12$.	96
Figura 63 - Absorção das soluções de LDL.	97
Figura 64 - Detecção de dienos conjugados para as amostras de LDL irradiadas com laser e oxidadas com íons metálicos.	98
Figura 65 - Concentração de hidroperóxidos lipídicos.	99
Figura 66 - Teste TBARS para as amostras de LDL irradiadas.	100
Figura 67 - Cromatograma de exclusão molecular das amostras de LDL irradiadas com três energias (300, 500 e 750 μJ) e LDL Nativa.	102
Figura 68 - Cromatografia de exclusão molecular das amostras irradiadas e oxidadas com íons metálicos.	103
Figura 69 - Eletroforese LDL.	104
Figura 70 - Emissão do corante ThT na presença da LDL Nativa, CuLDL, FeLDL e fsLDL	105
Figura 71-Microscopia eletrônica para as partículas de LDL nativa.	106
Figura 72- Microscopia eletrônica das partículas de LDL irradiada com 500 μJ .	106
Figura 73- Microscopia eletrônica para as partículas de LDL irradiadas com 712 μJ .	106
Figura 74 - Microscopia eletrônica para as partículas de CuLDL.	107
Figura 75 - Microscopia Eletrônica das partículas de FeLDL.	107
Figura 76 - Emissão do triptofano presente na partícula de LDL.	108
Figura 77 - Tempo de vida triptofano nas partículas de LDL, para excitação em 296 nm e emissão em 350 nm.	109

Figura 78 - Decaimento da anisotropia para as amostras irradiadas com 350 e 712 μJ e as amostras oxidadas com Cobre e Ferro, e do triptofano em solução aquosa. 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das lipoproteínas quanto a densidade, tamanho e apolipoproteína constituinte. Adaptado [18].....	22
Tabela 2 - Limites para os valores de Colesterol Total, HDL, LDL e Triglicerídeos de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia.	23
Tabela 3 – Solventes e reagentes utilizados.....	48
Tabela 4- Valores dos Limites de Detecção e Quantificação para o complexo EuCTc na presença da LDL Nativa, e oxidada.....	68
Tabela 5 - Tempo de vida do Európio no complexo EuCTc:LDL Nativa.....	70
Tabela 6- Tempo de vida do Európio no complexo EuCTc:CuLDL.....	70
Tabela 7 - Comparação entre os limites de detecção e quantificação para o corante ThT na presença da LDL Nativa e oxidada.....	77
Tabela 8 - Comparação entre os limites de detecção e quantificação para os dois biossensores EuCTc e ThT.	78
Tabela 9 - Valores obtidos dos níveis plasmáticos de Colesterol Total, HDL, Triglicerídeos, LDL e Glicose.	79
Tabela 10- Valores de temperatura das soluções antes e após a irradiação com laser	93
Tabela 11 - Numeração utilizada na eletroforese.	104
Tabela 12- Cálculo do tempo de vida médio de decaimento do Triptofano na LDL.	111
Tabela 13 - Valores obtidos para anisotropia das partículas de LDL com emissão em 350 nm.	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EuCTc : Európio-Clorotetraciclina

EuTc: Európio-Tetraciclina

ThT: Tioflavina T

Eu: Európio

CTc: Clorotetraciclina

LDL : Lipoproteína de baixa densidade

DCV: Doenças Cardiovasculares

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade.

IDL: Lipoproteína de densidade intermediária.

HDL: Lipoproteína de alta densidade.

apoB-100 : apolipoproteína B-100

apoB-48: apolipoproteína B-48

apoE: apolipoproteína E

apoC: apolipoproteína C

TG: Triglicerídeos.

Trp: Triptofano

Lp(a): Lipoproteína a

LDL(-): LDL minimamente oxidada

CuLDL: Lipoproteína de baixa densidade oxidada por íons de Cobre

FeLDL: Lipoproteína de baixa densidade oxidada por íons de Ferro

Fs-LDL: Lipoproteína de baixa densidade irradiada com laser de pulsos ultracurtos.

Cu:Cobre

Fe:Ferro

La: Lantânio

Lu: Lutécio

Y: Itérbio

Sc: Escândio

Xe: Xenônio

S₀: Estado Singleto Fundamental

S₁: Estado Singleto Excitado

T: Estado Tripleto

TICT: Transferência de carga intramolecular torcida

LE: Estado Localmente Excitado

CPA: Amplificação de Pulsos com varredura em Frequência

Ti:Al₂O₃ : Titânio-Safira

MOPs: Ácido propanesulfônico 3 (N-Morpholino)

Mg: Magnésio

Ca: Calcio

H₂O : Água bideionizada

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

FPLC: Fast protein liquid chromatography

HCL: Ácido Clorídrico

EuCl₃.6H₂O: Cloridrato de Európio Hexahidratado

C₂₂H₂₄Cl₂N₂O₈: Cloridrato de Clorotetraciclina

CaCl₂.2H₂O: Cloreto de Cálcio dihidratado

MgSO₄.7H₂O: Sulfato de magnésio heptahidratado

COLSAN: Associação Beneficente de Coleta de Sangue

CuSO₄: Sulfato de Cobre

FeSO₄.7H₂O: Sulfato Ferroso Heptahidratado

PBS: Tampão Fosfato-Salino,

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

TRIS: Tris(hidroximetil)-aminometano

MDA: Malondialdeído

TBARS: Teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico

IPEN: Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares

CLA: Centro de Lasers e Aplicações

B: Amplitudes do sinal

τ : tempos de decaimento

$\langle \tau \rangle$: tempo de decaimento médio

λ : comprimento de onda

$\Delta[\text{LOOH}]$: Hidroperóxido lipídico.

ΔA_{234} : Variação da absorção em 234 nm

ϵ_{cd} : coeficiente de extinção de dienos conjugados.

a: Coeficiente linear

b: Coeficiente angular

σ : Incerteza da medida

ϕ : tempo de correlação rotacional

A_{∞} : Anisotropia residual.

CARACTERIZAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL) POR MEIOS ESPECTROSCÓPICOS

Letícia Bonfante Sicchieri

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar se o complexo Európio-Clorotetraciclina (EuCTc) ou o corante Tioflavina T (ThT) podem atuar como biossensores precisos e eficientes de colesterol numa fração específica, através de procedimentos simples. Para isso estudaram-se as propriedades ópticas do complexo EuCTc e ThT na presença da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) em seu estado nativo e em seu estado oxidado. O primeiro estudo realizado verificou a melhor razão molar entre o Európio e a Clorotetraciclina, em seguida verificou-se a influência da diálise da LDL na emissão do complexo EuCTc, para obtenção de um protocolo para quantificação da concentração da LDL. Foram traçadas as curvas de calibração da emissão do complexo EuCTc com várias concentrações da LDL nativa, LDL oxidada com íons de Cobre e LDL oxidada com íons de Ferro. Em seguida obteve-se o tempo de vida do íon Európio no complexo EuCTc na presença de diferentes concentrações de LDL nativa e LDL oxidada por íons de Cobre. Na segunda parte do trabalho estudou-se a emissão do corante Tioflavina T na presença da LDL nativa e LDL oxidada. Na terceira etapa as propriedades ópticas dos biossensores EuCTc e ThT foram investigadas na presença do plasma sanguíneo e foram comparadas às emissões do complexo EuCTc e o corante ThT com a LDL ultracentrifugada, para verificar a possibilidade de quantificar a LDL diretamente no plasma sanguíneo. Na última etapa do trabalho desenvolveu-se uma nova metodologia para oxidar a partícula de LDL a partir da irradiação com laser de pulsos ultracurtos, a fim de produzir uma oxidação branda da partícula de LDL e controlada.

Palavras chaves: Európio-Clorotetraciclina, Tioflavina T, Lipoproteína de Baixa Densidade.

CHARACTERIZATION OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) BY SPECTROSCOPIC METHODS

Letícia Bonfante Sicchieri

ABSTRACT

The present study aims at assessing the complex Europium-Clorotetracycline (EuCTc) or the dye Thioflavin T (ThT) can act as biosensors accurate and efficient in a specific fraction of cholesterol through simple procedures. For this purpose, it was studied the optical properties of Europium- Chlortetracycline (EuCTc) complex and the thioflavin T (ThT) dye in the presence of low-density lipoprotein (LDL) in native state and in oxidized state *in vitro*. First study realized it was verified the influence of dialysis in the emission of complex EuCTc in the presence of LDL, thereby producing a protocol for use of the complex to obtain the concentration of LDL. It was obtained the calibration curves of the complex with various concentrations of native LDL, the oxidized LDL with copper ions and oxidized LDL with iron ions. It was also obtained from the calibration curve of the emission of the complex in the presence of calcium interferent ion with the concentration found in blood plasma with the oxidized LDL with copper ions. It was obtained the lifetime of the europium ion in the complex in the presence of different concentrations of Native LDL and oxidized LDL by copper ions. In the second part of the work it was studied the emission of the dye thioflavin T in the presence of native LDL and oxidized LDL. In the third part the optical properties of biosensors EuCTc and ThT were investigated in the presence of blood plasma and compared to the emission of the complex EuCTc and the dye ThT with LDL ultracentrifugated to verify the possibility of quantifying directly LDL in blood plasma. In the final part of this work it has developed a new methodology for the LDL particles oxidation from the irradiation of ultrashort laser pulses in order to produce mild and controlled oxidation of the LDL particle.

Keywords: Europium-Chlortetracycline, Thioflavin T, Low Density Lipoprotein.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morte e segundo o Ministério da Saúde, a faixa etária está entre 35 a 64 anos de idade [1].

Das DCVs, a aterosclerose tem sido amplamente estudada, e sabe-se que o aumento da concentração de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) está relacionado ao seu desenvolvimento [2].

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte de colesterol no plasma sanguíneo. As partículas de lipoproteínas podem ser classificadas em cinco classes diferentes: quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), partículas de lipoproteína de densidade intermediária (IDL), partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL).

Recentes estudos mostraram que a LDL oxidada é mais aterogênica que a LDL em seu estado nativo [3, 4, 5]. Visando uma melhor compreensão e controle desse processo a oxidação da LDL *in vitro* vem sendo extensivamente estudada.

A oxidação *in vitro* é normalmente feita através de íons metálicos como Cobre [6] e Ferro [7]. Entretanto, outras metodologias têm sido desenvolvidas para oxidação da partícula de LDL como a irradiação com raios gama emitidos em fontes de Cobalto ou Césio [8] e irradiação com ultravioleta [9].

Devido ao aumento das doenças cardiovasculares e a relação com o aumento plasmático de LDL, têm se pesquisado novos biossensores para auxiliar nos estudos *in vitro*. Desses novos marcadores pode-se citar o complexo Európio-Tetraciclina (EuTcs) [10] e o corante benzotiazol Tioflavina T [11].

A quantificação da LDL no plasma pode ser obtida através de duas maneiras: pelos métodos diretos e método indireto, sendo esse último, o utilizado em rotinas de laboratórios. Os métodos diretos são muitas vezes técnicas trabalhosas, demoradas e com alto custo, já o método indireto apresenta algumas limitações com relação ao seu uso [12].

Os biossensores utilizados nesse trabalho foram o complexo Európio-Clorotetraciclina e o corante Tioflavina T (ThT).

O complexo EuTcs é utilizado como biomarcador de diversas proteínas e estudos recentes mostram que o complexo EuCTc pode ser utilizado para quantificar as partículas

de LDL [10]. Na presença de íons interferentes o complexo EuCTc apresenta uma maior emissão do complexo na presença da LDL oxidada, quando comparado com a emissão do complexo na presença da LDL oxidada sem o íon interferente [13].

A Tioflavina T é um corante benzotiazol amplamente utilizado para marcar fibrilas de amiloidose formadas em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer [13,14,15]. As partículas de LDL em seu estado oxidado formam fibrilas semelhantes às fibrilas de amiloidose [16]. Griffin e colaboradores mostraram que a Tioflavina T pode ser utilizada para marcar risco cardiovascular [11].

Portanto o presente trabalho busca desenvolver uma nova metodologia para quantificação da LDL diretamente no plasma através de biossensores de baixo custo e também estudar a modificação da partícula de LDL através da irradiação com laser de pulsos ultracurtos para desenvolver uma nova metodologia para oxidar a LDL.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são:

Preparação das soluções de EuCTc, EuCTc:interferentes e obtenção das curvas de calibração na presença da LDL Nativa e LDL oxidada, e o estudo do tempo de vida de emissão do íon Európio nas diferentes soluções do complexo.

Preparação da solução do corante Tioflavina T e obtenção das curvas de calibração na presença da LDL nativa e LDL oxidada.

Realização de um primeiro estudo da emissão do complexo EuCTc e do corante ThT na presença do plasma humano, através da caracterização espectroscópica dos biossensores na presença de diferentes quantidades de plasma.

Desenvolvimento de uma nova metodologia para oxidação *in vitro* das partículas de LDL nativa através da irradiação com laser de femtossegundos com diferentes tempos de irradiação e diferentes energias. Caracterização das soluções de LDL irradiadas com diferentes energias, através da absorção óptica, quantificação dos antioxidantes presentes, formação dos compostos na peroxidação lipídica, acúmulo de cargas negativas na superfície das soluções de LDL irradiadas e estudo da modificação promovida na proteína apoB-100 e comparação desses parâmetros com duas metodologias (oxidação por íons de Cobre e Ferro) existentes para oxidação da partícula de LDL.

O principal processo de separação das lipoproteínas no plasma é a ultracentrifugação [20]. As lipoproteínas são divididas em cinco classes diferentes: os quilomicrons, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a lipoproteína de densidade intermediária (IDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL) [20]. Dentre as classes de lipoproteínas existem ainda subclasses. A Figura 2 mostra a distribuição das lipoproteínas com relação ao seu diâmetro e a Tabela 1 algumas características das lipoproteínas.

Figura 2- Distribuição da densidade e tamanho das lipoproteínas. [18].

Quilomicrons: São sintetizados pelas células intestinais e são responsáveis pelo transporte dos lipídeos da dieta absorvidos pelo intestino. A apolipoproteína principal presente nos quilomicrons é a ApoB-48. Possuem a mesma via metabólica das VLDL produzidas pelo fígado e assim como as VLDL os quilomicrons são submetidos à ação da enzima lipase lipoproteica na parede dos capilares [21].

VLDL (Lipoproteína de densidade intermediária): São sintetizadas no fígado e sua principal função é o transporte para o plasma sanguíneo dos triglicerídeos produzidos no fígado. A VLDL possui as seguintes apolipoproteínas: apoB-100; apoE e apoC. Quando em contato com a enzima lipase proteica as VLDL dão origem as IDL (Lipoproteína de densidade intermediária)[22].

IDL (Lipoproteína de densidade intermediária): É um produto intermediário na formação da LDL. A VLDL em contato com a enzima lipase proteica pode dar origem a IDL em seguida a IDL sofre a ação da lipase hepática formando a LDL [18].

HDL (Lipoproteína de alta densidade): São sintetizadas no intestino e no fígado e é a menor das lipoproteínas e a mais densa. As apolipoproteínas A (A-I; A-II e A-IV) são as principais apolipoproteínas constituintes da HDL, mas também pode conter apoC e em particular a apo-E [23].

LDL (Lipoproteína de baixa densidade): São as principais transportadoras de colesterol no plasma sanguíneo para os tecidos periféricos [24] e será abordada com mais detalhes posteriormente.

Tabela 1 – Classificação das lipoproteínas quanto a densidade, tamanho e apolipoproteína constituinte. Adaptado [18]

Classificação	Densidade g/mL	Tamanho nm	ApoB Principal	Outras Apolipoproteínas
Quilomicrons	0.93	75-1200	ApoB-48	A-I, A-IV, C-I, C-II, C-III
VLDL	0.930-1.006	30-80	ApoB-48	E, A-I, A-II, A-V, C-I, C-II, C-III
IDL	1.006-1.019	25-35	ApoB-100	E, C-I, C-II, C-III
LDL	1.019-1.063	18-25	ApoB-100	
HDL	1.063-1.210	05-12	ApoA-I	A-II, A-IV, E, C-III

Toda partícula de lipoproteína contém uma apolipoproteína. As apolipoproteínas controlam o metabolismo da lipoproteína ligando-se em receptores de membranas específicos e agem como um cofator para enzimas que participam do metabolismo das lipoproteínas. As apolipoproteínas também são essenciais para a integridade estrutural da partícula.

A lipoproteína mais abundante no plasma e principal transportadora de colesterol no plasma sanguíneo é a lipoproteína de baixa densidade (LDL) [24].

O plasma sanguíneo é a parte líquida do sangue, onde as células vermelhas e células brancas encontram-se suspensas. Apresenta uma coloração amarelada e corresponde a 55% do volume sanguíneo total.

O plasma é constituído por diversas substâncias como: água (~92 %), proteínas (albumina, fibrinogênio, dentre outras), sódio (~7%), gases, excretas, nutrientes, hormônios, lipoproteínas e enzimas.

O plasma é separado da parte celular através de centrifugação à 10.000 rpm por aproximadamente 15 min.

Segundo a sociedade brasileira de cardiologia os valores de colesterol total, HDL, LDL e Triglicerídeos são classificados conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Limites para os valores de Colesterol Total, HDL, LDL e Triglicerídeos de acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia.

Colesterol Total	Menor que 200 mg/dl → Desejável De 200 a 239 mg/dl → Limítrofe ≥ 240 mg/dl → Alto
HDL	Menor que 40 mg/dl → Risco aumentado para doenças cardiovasculares De 40 a 59 mg/dl → Quanto maior, melhor ≥ 60 mg/dl → Considerado fator protetor contra doenças cardiovasculares
LDL	Menor que 100 mg/dl → Nível ideal De 100 a 129 mg/dl → Nível próximo do ideal De 130 a 159 mg/dl → Limítrofe De 160 a 189 mg/dl → Alto ≥ 190 mg/dl → Muito alto
Triglicerídeos (TG)	Menor que 150 mg/dL → Normal De 150 a 199 mg/dL → Limítrofe De 200 a 499 mg/dL → Alto ≥ 500 → Muito Alto

3.1.2 Lipoproteína de Baixa Densidade

A LDL apresenta uma camada externa composta por uma monocamada de fosfolipídios contendo colesterolis não-esterificados livres, e uma única molécula de proteína a apolipoproteína-B (apoB-100). Já a parte interna é formada por um núcleo apolar composto basicamente por ésteres de colesterol e em menor quantidade triglicerídeos e alguns colesterolis não-esterificados, como mostrado na Figura 3 [25]. Associado a monocamada fosfolipídica da partícula de LDL estão presentes os antioxidantes associados como o α -tocoferol, β -caroteno e licopeno. O α -tocoferol é o antioxidante mais abundante [26].

A partícula de LDL apresenta forma esférica com um diâmetro médio de 22 nm. A LDL é subdividida em uma subespécie maior e menos densa, e uma subespécie pequena e densa. Essas subespécies diferenciam na susceptibilidade a modificações oxidativas e comportamento aterogênico [24], [25].

Figura 3- Estrutura da lipoproteína de baixa densidade. [25]

Na LDL a única proteína presente é a apo-B-100, localizada em torno da superfície da partícula da LDL, estabilizando a estrutura do complexo proteína-lipídio. Sua principal função é controlar o metabolismo da lipoproteína ligando-se em receptores de membrana específicos. É altamente insolúvel em solução aquosa, é constituída por 4.536 resíduos de aminoácidos e apresenta uma massa molecular de 550 kDa para forma glicosilada [27].

A partícula de LDL apresenta em sua proteína apoB-100 trinta e sete resíduos de triptofano. Desses resíduos de sete a oito estão localizados na superfície da apoB-100, e os vinte e oito a vinte e nove resíduos estão localizados no interior da região da apoB-100 [28], [29].

3.1.3 Triptofano

O triptofano é um aminoácido primário, ele recebe esse nome por ser um dos 20 aminoácidos encontrados em proteínas. Todos os aminoácidos apresentam uma estrutura básica comum que é um grupo carboxila e um grupo amino, ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α) e diferem entre si por suas cadeias laterais ou grupo R, que variam

em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água [17]. O carbono α é um centro quiral, os quatros grupos substituintes, conforme mostrado na Figura 4 (o grupo carboxila, o grupo amino, um grupo R e um átomo de Hidrogênio) podem ocupar duas disposições espaciais distintas, e essas são imagens especulares não superponíveis. As duas possibilidades de conformação molecular dos aminoácidos formam uma classe de estereoisômeros, chamada de enantiômeros, e são moléculas opticamente ativas, ou seja, podem girar a luz plano-polarizada.

Figura 4 - Estrutura básica de um aminoácido primário[17].

Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com seus grupos R, sendo divididos em cinco classes principais:

Grupo R não polares e alifáticos: Glicina, alanina, prolina, valina, leucina, isoleucina e metionina.

Grupo R Aromático: fenilalanina, tirosina e triptofano

Grupo R não carregados, mas polares: serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina

Grupo R carregados positivamente (básicos): lisina, arginina e histidina.

Grupo R carregados negativamente (ácidos): aspartato e glutamina.

Através da classificação dos aminoácidos primários observa-se que o triptofano é um aminoácido com um anel aromático, e relativamente apolar. O triptofano apresenta uma região polar em virtude do anel indol, a estrutura do triptofano pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura molecular do triptofano [17].

O triptofano absorve luz na região do ultravioleta (280 nm) e emite em 350 nm, sendo considerado uma sonda fluorescente, e é amplamente utilizado para estudos das estruturas e modificações das proteínas [30],[31], [32].

3.1.4 Processo de oxidação da partícula de LDL

Pesquisas mostram que a oxidação da partícula de LDL está altamente relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entretanto o mecanismo de oxidação da partícula *in vivo* ainda não está totalmente elucidado. A HDL remove o excesso de colesterol dos tecidos periféricos, e também age inibindo a oxidação da LDL. A lipoproteína de alta densidade (HDL) protege da formação de aterosclerose [33].

A modificação da partícula de LDL *in vivo* envolve espécies reativas de oxigênio produzidas por células endoteliais e macrófagos e algumas enzimas tais como mieloperoxidases [34] lipoxigenases [35], e heme-oxigenases I [36] presentes na íntima da artéria podem promover um processo de modificação da LDL. Avogaro e colaboradores [37] em 1988 publicaram um trabalho onde a partir de 18 pacientes normolipidêmicos foi isolada a LDL mais eletronegativa que a LDL nativa e ficou conhecida com LDL (-).

Acredita-se que a oxidação da LDL não ocorra na corrente sanguínea, pela alta concentração de antioxidantes presentes, mas sim na parede arterial [4], [33], [38]. O mecanismo da oxidação *in vivo* está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Mecanismo da oxidação da LDL *in vivo*. [3].

Uma das maneiras de se oxidar a lipoproteína *in vitro* é feita através de íons metálicos, como Ferro e Cobre [6], [7] os quais funcionam como catalisadores da decomposição de lipoperoxídeos.

O principal mecanismo da oxidação da LDL ocorre através da peroxidação lipídica [39], conforme indicado na Figura 7. A peroxidação lipídica divide-se em três etapas: a primeira etapa é chamada de iniciação. Nessa etapa os ácidos graxos poli-insaturados sofrem o ataque de uma espécie reativa (radicais livres) para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno o que irá formar um radical de carbono que após um rearranjo molecular forma um dieno conjugado (uma ligação simples entre duas duplas ligações). Na segunda etapa conhecida como propagação ocorre que o radical alquila se combina com um átomo de oxigênio formando um radical peroxila. Em seguida esse radical peroxila reage com um hidrogênio alílico de outro ácido graxo, formando um radical de carbono que é denominado hidroperóxido lipídico. A última etapa denominada fase de terminação ocorre à aniquilação dos radicais formados, formando produtos não-radicalares [40].

Figura 7 - Etapas da peroxidação lipídica [40].

3.1.5 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença progressiva, e o estudo com experimentos com modelo animal, principalmente com coelhos, tem contribuído para o entendimento da progressão da doença [41], [42].

Os fatores para o desenvolvimento da doença podem ser divididos em dois grupos: fatores genéticos e fatores ambientais. O aumento na concentração da LDL no plasma é dito como o precursor, e diferentes níveis de aterogenicidade da LDL são um pré-fator para a maioria das formas da doença [43].

Fatores genéticos e ambientais foram alvos de vários estudos familiares e de gêmeos, a herdabilidade da aterosclerose foi considerada alta na maioria dos estudos, excedendo 50% [44]. Já em estudos de migração de população, o fator ambiental explicou muitas das variações da doença entre populações [45]. As formas mais comuns das doenças cardiovasculares (DCV) resultam da combinação da susceptibilidade genética, aumento da expectativa de vida e de uma alimentação pouco saudável.

O evento inicial da aterosclerose é o acúmulo de LDL na matrix subendotelial(Figura 8). O acúmulo da LDL na parede das artérias apresenta lugares preferenciais devido à variação de fluxo sanguíneo. A LDL difunde passivamente através das junções de células endoteliais e a retenção na parede do vaso ocorre devido a interações entre a apoB-100 e a matrix proteoglicana [2]. Além da LDL, existe a lipoproteína (a) que também pode acumular na intima e promover aterosclerose [46]. A lipoproteína (a) (Lp(a)) é igual a LDL mas apresenta outra apolipoproteína denominada apolipoproteína (a) ligada a ApoB-100 por uma ponte de dissulfeto [47], [48]. A massa da apo(a) varia de 200 a 800 kDa [49]. A síntese da apo(a) ocorre no fígado, sendo primeiramente secretada na superfície dos hepatócitos, e lá ocorre a ligação com a LDL para formar a Lp(a). Dangas G. e colaboradores [50] mostram que a Lp (a) está presente em amostras de ateroma coronário e é encontrado em maiores quantidades no tecido em pacientes com angina instável, em relação a tecidos de pacientes com angina estável.

Sabe-se que a LDL em seu estado nativo não seria reconhecida pelos macrófagos rapidamente para formar as células espumosas, devido a isso se propôs que a LDL sofre alguma modificação na parede do vaso [51]. Em lesões iniciais uma das modificações mais importantes na partícula de LDL é a oxidação lipídica devido à exposição a resíduos oxidativos de células vasculares. [52]. Devido ao acúmulo de lipoproteínas na intima das artérias, os monócitos passam a aderir à superfície do endotélio e posteriormente os monócitos migram através da monocamada endotelial para à intima, se proliferando e diferenciando-se em macrófagos que consomem as lipoproteínas formando as células espumosas. As placas podem tornar-se cada vez mais complexas com o surgimento de calcificação, ulceração na superfície luminal e hemorragia dos pequenos vasos que crescem no sentido da lesão.

As lesões mais avançadas crescem o suficiente para bloquear o fluxo de sangue, formando trombos ou coágulos de sangue resultando em infarto do miocárdio.

Figura 8- Eventos iniciais à formação da placa de aterosclerose [53].

A LDL em seu estado oxidado começa a formar uma estrutura semelhante à encontrada nas fibrilas de amiloidose [16]. As fibrilas de amiloidose são modificações em algumas proteínas formando pequenos aglomerados, essas fibrilas são encontradas em doenças neurodegenerativas como Mal de Parkinson e Alzheimer [54].

A amiloidose resulta de uma progressão de alterações no desdobramento de proteínas que induz o depósito de fibrilas amilóides insolúveis, principalmente nos espaços extracelulares de órgãos ou tecidos. As fibrilas de amiloidose apresentam uma estrutura secundária idêntica, a configuração β -pregueada, além disso, todo depósito de amiloidose contém a pentraxina amilóide P sérica (SAP) e glicosaminoglicanos [55].

No estudo com difração de raio-X mostraram que as fibrilas de amiloidose apresentam uma estrutura fibrilar linear não ramificada, os agregados tem um diâmetro de 7,5 – 10 nm [56]. A estrutura β -pregueada é que permite a ligação com alguns corantes possibilitando o diagnóstico de amiloidose.

Para a LDL oxidada a estrutura semelhante à amiloidose se deve a uma modificação e perda de lipídios comprovado por medidas de velocidade de sedimentação. A diminuição no tamanho do núcleo lipídico impõe restrições de conformação no domínio das folhas- β [16].

3.1.6 Metodologias de quantificação de LDL

A quantificação da LDL pode ser obtida de duas maneiras: métodos diretos e métodos indiretos [57].

O método indireto é o mais utilizado em rotinas de laboratório por apresentar vantagens como: baixo custo e a facilidade de utilização. O método indireto é feito através da Fórmula de Friedewald.

Em 1972, Friedewald e colaboradores [58] publicaram uma metodologia para quantificação de LDL sem necessitar da ultracentrifugação do plasma sanguíneo. A quantificação é feita através da equação 1:

$$C_{LDL} = C_{Col.Total} - C_{HDL} - \frac{C_{TG}}{5} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

C_{LDL} é a concentração de LDL no plasma;

$C_{Col.Total}$ é a concentração do colesterol total em mg.dL^{-1} ;

C_{HDL} é a concentração do colesterol HDL em mg.dL^{-1} ;

C_{TG} é a concentração de triglicerídeos em mg.dL^{-1} .

Na fórmula de Friedewald utiliza-se a quantificação de triglicerídeos dividida por cinco, pois essa razão está relacionada à concentração de VLDL presente no plasma sanguíneo. Em indivíduos normais e em pacientes com todos os tipos de hiperlipoproteinemias, exceto o raro tipo III, e em jejum onde a concentração de quilomicrons é muito pequena, a relação entre a massa de triglicerídeos e a concentração de VLDL permanece constante na razão 5:1, ou seja, a maior parte dos triglicerídeos encontrado no plasma está contido na fração da VLDL [58].

Entretanto a utilização da fórmula de Friedewald apresenta algumas restrições: o sangue deve ser coletado em jejum para evitar que a amostra apresente quilomicrons; o paciente não deve ter concentração de triglicerídeos acima de 400 mg.dL^{-1} e pacientes com disbetalipoproteinemia Tipo III. Estudos mostram também que pacientes com diabetes e doenças no fígado e rim também não poderiam ter seu LDL quantificado pela fórmula, mesmo possuindo concentração de triglicerídeos abaixo de 400 mg.dL^{-1} [59], [12].

Os métodos diretos de quantificação da LDL podem ser divididos em três gerações:

Os métodos de primeira geração usam precipitação química para quantificar o colesterol LDL. A precipitação ocorre através da reação entre a LDL e alguns reagentes como heparina em pH 5.12 (*Merck*, *Genzyme*, e *Polymedco*) [60], polivinilsulfato

(Diagnóstica Roche) [61], [62], polímeros anfipáticos inespecíficos (BioMerieux) ou sulfato de dextran (Progen) [63]. A quantificação pode ser feita de duas maneiras, primeiro é obtido o valor do colesterol total, em seguida faz a centrifugação do precipitado de LDL e calcula-se a diferença entre o colesterol total e o supernadante (sem LDL), ou através da quantificação direta após a LDL ser dissolvida do precipitado.

Os métodos de segunda geração são os métodos de imunosseparação *Direct LDLTM* (Genzyme Diagnostics and Sigma Diagnostics). É feita a reação do plasma com anticorpos policlonais para apoA-I e apo-E humanos, esses anticorpos removem as partículas de quilomicrons, HDL, VLDL e IDL, e depois é feita a quantificação direta da LDL [64].

Os métodos de terceira geração são os ensaios homogêneos. Os ensaios possuem diferentes detergentes e outros produtos químicos que permitem o bloqueio específico ou a solubilização de classes de lipoproteínas, conseguindo atingir especificamente a LDL, em seguida a concentração de LDL pode ser medida diretamente na mesma cubeta [65], [66].

Os métodos diretos são pouco utilizados em rotinas de laboratório de análises clínicas devido ao seu alto custo e algumas técnicas são demoradas e muito trabalhosas. Portanto, o desenvolvimento de novas técnicas para quantificação do colesterol LDL de forma direta é necessária para se ter uma maior precisão no diagnóstico.

No próximo capítulo são apresentados dois biossensores candidatos à quantificação direta do colesterol LDL diretamente no plasma através de uma técnica simples e de baixo custo.

3.2. Biossensores

3.2.1 Európio-Clorotetraciclina

3.2.2 Lantanídeos

Os lantanídeos são os elementos da tabela periódica, como mostrado na Figura 9 que vão do Lantânio (La, Z=57) ao Lutécio (Lu, Z=71), entre os quais se incluem o Ítrio (Y, Z= 39) e o Escândio (Sc, Z= 21) [67, 65].

Apesar de atribuir-se ao ano de 1787 como início da história das Terras Raras, quando Axel Arhenius encontrou um mineral escuro, a Iterbita, em uma pequena vila, Yterby próximo a Estocolmo, o primeiro elemento das terras raras descoberto foi o Cério, em 1751, pelo mineralogista suíço A. F. Cronstedt quando obteve um mineral pesado chamado de Cerita [68].

Devido a sua configuração eletrônica, os lantanídeos apresentam propriedades químicas e físicas muito semelhantes. Para os íons trivalentes é observado um aumento regular na configuração $4f^n$ ($n= 1-14$). A configuração eletrônica pode ser resumida em $[Xe]4f^n5s^25p^65d^{0-1}6s^2$ e através dessa observa-se que os orbitais 4f estão protegidos do ambiente químico pelos orbitais 5s e 5p e ainda 5d e 6s.

www.tabelaperiodicacompleta.com

Figura 9- Tabela Periódica mostrando os íons lantanídeos.

O estado de oxidação trivalente é o mais comum e característico da grande maioria dos compostos de terras raras e é o mais estável termodinamicamente, não dependendo

apenas da configuração eletrônica, mas também de um balanço entre as energias de ionização, reticular, de ligação e de solvatação para as soluções.

Os lantanídeos formam complexos com caráter iônico, pois os orbitais 4f estão localizados na parte interna do átomo e são totalmente protegidos pelos elétrons dos orbitais 5s e 5p, têm extensão radial limitada e não participam das ligações, ocorrendo somente um envolvimento muito pequeno com os orbitais dos ligantes [69].

Uma característica importante dos íons lantanídeos é a ocorrência de contração lantanídica, que é uma diminuição uniforme no tamanho atômico e iônico com o aumento do número atômico. A contração lantanídica é devido ao efeito eletrostático associado com o aumento da carga nuclear blindada imperfeitamente pelos elétrons 4f [70].

Como os íons lantanídeos apresentam baixa absortividade molar, a excitação direta é pouco eficiente, então se usa um ligante que absorve luz e este transfere energia para o íon lantanídeo que emite sua luminescência. Esse efeito é conhecido como Efeito Antena, onde o íon ligante absorve a energia, transfere para o íon lantanídeo, e por fim o íon lantanídeo emite em suas bandas características. A eficiência da transferência de energia do ligante para o íon lantanídeo depende da natureza química do ligante coordenado com o íon lantanídeo [68], [71].

3.2.3 Európio

O íon Európio (Eu, $Z = 63$) é o lantanídeo mais conhecido devido às suas propriedades luminescentes, foi descoberto em 1901 por Eugene Anole Demarcay e apresenta configuração eletrônica $[\text{Xe}]4f^7 6s^2$. Os níveis de energia envolvidos nas transições eletrônicas são não degenerados [72]. As transições observadas no espectro de emissão do íon Európio na região do visível podem ser observadas na Figura 10.

A emissão do íon Európio ocorre da transição do nível 5D_0 para o estado fundamental 7F_J onde J varia de 0 a 6.

Devido à baixa absortividade molar do íon Európio, a utilização de um agente quelante aumenta o rendimento quântico da emissão e o tempo de vida do complexo comparado com o íon livre. Após a complexação do íon Európio com o agente quelante ocorre uma diminuição do número de moléculas de água na coordenação do Európio o que gera um aumento na emissão do íon Európio mesmo em solução aquosa.

Figura 10- Diagrama de níveis de energia do íon Eu^{+3} . [73]

3.2.4 Tetraciclina

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro usado em tratamentos de diversas infecções bacterianas. A tetraciclina é produto da fermentação de uma bactéria do solo conhecida como *Streptomyces aureofaciens*. O primeiro membro da série a ser descoberto foi a clorotetraciclina no final da década de 40 por Benjamin Duggar [74]. Em 1950 descobriram a oxitetraciclina e em 1953 ocorreu à descoberta da tetraciclina que é a substância mais simples desta família de antibióticos. Na Figura 11 é possível observar a estrutura geral dos membros da família da tetraciclina, a Figura 12 mostra os diferentes radicais que formam os compostos da família das tetraciclinas.

Figura 11 - Estrutura da Clorotetraciclina [75].

Compound	Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Tetracycline (TC)	A	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Oxytetracycline (OTC)	A	H	CH ₃	OH	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Chlortetracycline (CTC)	A	Cl	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Doxycycline (DC)	A	H	CH ₃	H	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Minocycline (MINO)	A	N(CH ₃) ₂	H	H	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Methacycline (MTC)	A	H	=CH ₂		OH	N(CH ₃) ₂	H	H
Demeclocycline (DMCTC)	A	Cl	H	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	H
Rollitetracycline (PRMTC)	A	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H	^a
4-Epioxytetracycline (EOTC)	A	H	CH ₃	OH	OH	H	N(CH ₃) ₂	H
Anhydroxytetracycline (AOTC)	B	H	-	-	OH	N(CH ₃) ₂	H	H
4-Epitetracycline (ETC)	A	H	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂	H
Anhydrotetracycline (ATC)	B	H	-	-	H	N(CH ₃) ₂	H	H
4-Epianhydrotetracycline (EATC)	B	H	-	-	H	H	N(CH ₃) ₂	H
4-Epichlortetracycline (ECTC)	A	Cl	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂	H
4-Epidoxycycline (EDC)	A	H	CH ₃	H	OH	H	N(CH ₃) ₂	H

^a —CH₂—N

Figura 12- Estrutura da Tetraciclina e de seus derivados

Os anéis DBCA definem a estrutura da tetraciclina. A estrutura em anel é cercada tanto na parte de cima quanto na parte de baixo por zonas periféricas onde vários grupos químicos podem se ligar. A existência de três ou mais sítios de ligação e quatro a cinco sítios de dissociação prototrópica em cada molécula, fez com que a química de coordenação das tetraciclinas com diferentes metais fossem muito estudadas [73],[74], [76],[77].

Estudos indicaram que as ligações com outros grupos químicos podem ocorrer no anel A (tricarbonil) ou no anel DCB (fenólico β-dicetonas). Alguns desses sítios de ligação se tornam mais nucleofílicos após a desprotonação, portanto a capacidade de quelação varia com o pH da solução [78].

A tetraciclina é utilizada também como um agente quelante. A formação do complexo da tetraciclina com o íon Európio foi descrito em 1984. A tetraciclina apresenta uma luminescência molecular intrínseca e quando complexada com o íon Európio a tetraciclina transfere a energia intramolecular do seu estado tripleto para o nível excitado do íon Európio [79].

3.2.5 Complexo EuCTc

Hirschy e colaboradores, em 1984, [79] descreveram que quando complexada com o Eu^{3+} a tetraciclina apresenta uma ampla banda de absorção característica da molécula orgânica ligante. A sensibilização do európio foi utilizada para quantificar a presença de tetraciclina e de dois de seus análogos. Nesse mesmo artigo foi demonstrado que cada complexo de EuTc apresenta um perfil de emissão e que a tetraciclina apresenta uma dependência do pH. O complexo de EuTc apresenta uma máxima emissão com pH entre 6.7 – 8.5, sendo o pH 6.9 considerado ótimo.

Quando soluções do complexo EuTcs são excitadas com luz azul em torno de 400 nm ocorre a emissão fluorescente de acordo com o diagrama de Jablonski (Figura 13).

Primeiro ocorre a absorção da energia e os elétrons são excitados do estado singlete S_0 para o estado singlete excitado S_1 ($S_0 \rightarrow S_1$). A molécula perde energia não radioativa até atingir o nível vibracional de menor energia dentro do estado excitado singlete S_1 . A desexcitação deste estado pode ocorrer por:

(1) Fluorescência do íon ligante – que só ocorre quando não há cruzamento intersistema ($S_1 - T_1$) ou se ela não é favorecida. Essa transição tem um tempo de vida muito curto ($\sim 10^{-8}$ s).

(2) Cruzamento intersistema ($S_1 \rightarrow T_1$) – Nessa transição o elétron atinge o estado tripleto da molécula através da inversão do spin do elétron singlete. Aproximadamente 75% dos elétrons migram do estado singlete excitado para o estado tripleto por ser menos energético.

Após o cruzamento intersistema, a desexcitação do nível tripleto pode ocorrer:

(1) Decaimento não radioativo ($T_1 \rightarrow S_0$) – Essa transição só ocorre se não houver transferência de energia para o íon central, ou se essa transferência for pouco favorável.

(2) Fosforescência do ligante ($T_1 \rightarrow S_0$) – Novamente só ocorrerá se não houver a transferência de energia para o íon lantanídeo, ou se for pouco favorável.

(3) Transferência de energia – A transferência de energia entre a molécula ligante e o íon lantanídeo ocorre pela transferência de energia do nível tripleto T_1 para o estado excitado no íon lantanídeo 5D_n ($n=0,1$).

(4) Por fim ocorrerá a emissão do íon Európio através da depopulação do nível excitado 5D_0 para o estado fundamental 7F_J ($J= 0,1,2,3,4$). A principal transição do íon Európio no complexo EuCTc é a $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$.

A transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ é permitida por dipolo elétrico e sua intensidade é hipersensível a variações das ligações dos íons Eu^{3+} com a vizinhança, enquanto a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ é permitida por dipolo magnético e é amplamente utilizada para estudar estruturas quirais [71].

Figura 13 - Diagrama de Jablonski do complexo EuCTc.[80]

O complexo EuTcs apresenta um grande deslocamento de Stokes (~220 nm), devido as perdas de energia ocorridas durante a conversão interna, o cruzamento intersistema e a transferência de energia intramolecular [81]. A banda de emissão do íon Európio é estreita devido à proteção dos orbitais f pelos orbitais de maior energia s e p. O íon Európio no complexo apresenta um longo tempo de vida porque as transições f-f são proibidas por Laporte, gerando um estado excitado com longo tempo de vida, da ordem de 20 μs [82]. A utilização de um íon orgânico ligado ao íon Eu^{3+} , evita que ocorra “quenching” para moléculas do solvente (H_2O), fazendo com que a emissão do íon Eu^{3+} se torne mais intensa [67].

O complexo Európio-Tetraciclinas tem sido amplamente estudado no desenvolvimento de biossensores. Rakicioglu e colaboradores [83] publicaram em 1998

que a emissão do complexo EuTc aumenta cerca de 15 vezes na presença de peróxido de hidrogênio. M. Schäferling e colaboradores [84] mostraram que o complexo EuTc pode ser utilizado para monitorar a conversão do ATP (trisfosfato de adenosina) em seus produtos enzimáticos ADP, cAMP. Xiaoqing Zhu e colaboradores [85] publicaram a utilização do complexo para determinar traços de heparina.

Silva e colaboradores [10] descreveram que o complexo EuTc pode ser utilizado como um marcador para LDL, pois a emissão do complexo EuTc aumenta na presença da LDL. Teixeira e colaboradores [13] descreveram que o complexo EuCTc na presença de íons interferente (Cálcio, Magnésio, dentre outros) com a LDL oxidada apresenta uma emissão maior do que quando o complexo EuCTc está somente com a LDL oxidada.

3.3 Tioflavina T

A Tioflavina T (ThT) é um sal pertencente ao grupo dos corantes tiazol, derivado do composto 2 (P-amino-fenil)-6-metil-benzotiazole [86]. A estrutura da ThT (Figura 14) pode ser dividida em três fragmentos:

- (1) – Um anel Benzotiazol
- (2) – Um anel Benzeno
- (3) – Um grupo dimetilamino

Figura 14 - Estrutura Tioflavina T. [87]

Os três grupos que formam a estrutura da Tioflavina T são muito rígidos e tanto a sua estrutura quanto o comportamento fotofísico são determinados majoritariamente pelas suas orientações espaciais [88, 89].

Estudos recentes demonstraram que a ThT comporta-se com um Rotor Molecular [88],[89],[90]. Rotores moleculares são moléculas fluorescentes caracterizados pela capacidade de formar estados torcidos através da rotação de um dos seus fragmentos com relação ao restante da molécula [91]. As rotações intramoleculares alteram as energias do estado fundamental e do estado excitado e a desexcitação ocorre pela não emissão de fótons ou pela emissão em comprimentos de onda diferentes do comprimento de onda de excitação, sendo também altamente dependente do solvente. Os rotores moleculares são definidos através de um mecanismo denominado Transferência de Carga Intramolecular (CT) [92].

A Transferência de Carga Intramolecular apresenta um grupo doador de elétrons e um grupo aceptor que estão conectados via conjugação- π . Um elétron de um orbital ligante do doador (Radical Catiônico) é delocalizado para um orbital não ocupado de um aceptor

(Radical Aniônico), a conjugação- π permite a interação entre o grupo doador e o grupo receptor e os orbitais do grupo doador apresentam uma sobreposição espacial negligenciada. A Transferência de Carga Intramolecular é caracterizada por um aumento no momento de dipolo do estado excitado. Em geral esses sistemas moleculares podem emitir fluorescência proveniente de dois estados eletrônicos, conforme ilustrado na Figura 15. O primeiro inicia-se com a excitação da molécula e é denominado como a emissão originária de um estado singlete (LE-Localmente Excitado). O segundo (TICT-Transferência de carga intramolecular torcida) vem desse primeiro e possui um aumento de dipolo maior que o estado LE [93], [94].

Figura 15- Esquema qualitativo do estado fundamental e estado excitado em TC [91].

Separando a molécula de ThT em três partes com dois ângulos de torção entre elas, o ângulo ϕ entre o fragmento (1) e o (2), e o ângulo ψ entre o fragmento (2) e o (3), Maskevich e colaboradores [87], [88] estudaram a conformação da molécula de ThT através de simulação computacional e viram que a ThT apresenta energia mínima de superfície correspondendo conformações estáveis com energias iguais para $\phi = 37^\circ, 145^\circ, 217^\circ$ e 325° e $\psi = 0$ e 180° , conforme observado na Figura 16. A energia de barreira entre os fragmentos (1) e (2) é relativamente baixa $\Delta E \approx 700 \text{ cm}^{-1}$ enquanto que a barreira restringindo a mobilidade do grupo dimetilamino é considerada maior $\Delta E \approx 2800 \text{ cm}^{-1}$. A presença do grupo metil ligado ao N5 no anel benzotiazol impede a conformação planar da molécula de ThT com relação ao ângulo ϕ , já entre os fragmentos (2) e (3) são coplanares.

Figura 16 - Dependência do nível fundamental com relação aos ângulos (A) Energia de superfície E_{s0} (ϕ, ψ, ω_0) vs. ϕ, ψ (B) Dependência energética do ângulo ϕ (ψ pode variar) (C) Dependência energética no ângulo ψ (ϕ pode variar). Os cálculos foram obtidos a partir do método AMI. [88].

Toda molécula tem uma tendência a encontrar a conformação de menor energia e normalmente é uma conformação planar, entretanto na Tioflavina T, o estado fundamental a molécula apresenta um ângulo de torção entre os fragmentos (1) e (2) de $\phi = 37^\circ$ [90]. De maneira semelhante para o estado excitado a molécula rapidamente assume sua configuração de menor energia através de uma rotação intramolecular e para Tioflavina T a configuração de menor energia para o estado excitado é obtida quando os fragmentos (1) e (2) estão rotacionados em 90° , Figura 17.

Figura 17 - Energias do Estado Fundamental e Estado Excitado da ThT em função do ângulo de torção ϕ [90].

A excitação da molécula de ThT pode ser representada pela Figura 18. Após a foto-excitação o corante transita para um estado não-relaxado LE (Localmente Excitado), após a relaxação para níveis vibracionais de menor energia (Franck-Condon) a molécula de ThT retorna para o estado fundamental pela emissão fluorescente (Γ), além da emissão fluorescente a molécula de ThT transita para o estado excitado TICT (Transferência de carga intramolecular torcida) (ϕ de $\approx 37^\circ$ para $\phi \approx 90^\circ$) através da torção ao longo da ligação C-C entre os fragmentos (1) e ((2)+(3)) e retorna para o estado fundamental através de perdas não radioativas, a emissão do estado excitado TICT é proibida [89]. A torção ao longo do ângulo ϕ é altamente dependente da polaridade do solvente e da viscosidade do solvente [87].

Figura 18 - Esquema da desexcitação da molécula de Tiflavina T. [89]

A força de oscilador f do $S_0 \rightarrow S_1$ muda significativamente após a torção da ThT para $\varphi \sim 37^\circ$ $f \approx 1$ para $\varphi \sim 90^\circ$ $f \approx 0$, o que indica que ocorre uma alternância entre a emissão LE (S_1) e não-fluorescente TICT- S_1' . A torção da molécula entre os fragmentos (1) e ((2) + (3)) é considerada uma reação da transição coordenada para $LE \rightarrow TICT$ [88].

Além da torção da molécula no estado excitado, ocorre também uma redistribuição da densidade eletrônica. No fragmento (1) acontece uma diminuição da carga de +0,7e para +0,3e, enquanto que a carga associada ao anel benzeno e o grupo dimetilamino aumenta de +0,3e para +0,7e [87].

O primeiro trabalho a respeito da utilização da ThT como um biomarcador foi com Vassar e Culling em 1959 que mostraram o aumento na emissão fluorescente do corante na presença das fibrilas de amiloidose [95]. As fibrilas de amiloidose são formadas principalmente em doenças neurodegenerativas, como Mal de Parkinson e Alzheimer. As diferentes proteínas que formam as fibrilas de amiloidose apresentam uma característica em comum um desdobramento em folhas- β perpendiculares ao longo do eixo da fibrila [96].

Varias publicações tentaram explicar a ligação entre a ThT e as fibrilas de amiloidose e o grande aumento na emissão do corante. Kelényi e colaboradores [86] mostraram que o

nitrogênio do tiazol se liga ao grupo hidroxil das estruturas dos tecidos formando uma ligação de hidrogênio, sendo essa, a ligação específica das moléculas corantes as fibrilas de amiloidose e outras estruturas dos tecidos. Khurana e colaboradores [97] demonstraram através de análise de condutividade elétrica que a Tioflavina T em solução aquosa formaria micelas e que na presença de fibrilas de amiloidose as micelas formariam ligações de hidrogênio e essas ligações seriam responsáveis pelo aumento da emissão fluorescente do corante. Já o modelo de Krebs sugere que a ThT é inserida nas ranhuras formadas pelas cadeias laterais dos aminoácidos que formam as folhas- β [98]

Entretanto publicações recentes demonstraram que a molécula de ThT é um rotor molecular e na presença das fibrilas de amiloidose a liberdade de rotação intramolecular diminui, não ocorrendo mais a transição do estado excitado LE para o estado excitado TICT, diminuindo assim a perda não radioativa e consequentemente aumentando a emissão fluorescente do corante [88, 90, 91,100].

Em 1967, dois patologistas (Saeed e Fine) compararam vários corantes e concluíram que a Tioflavina T era melhor para detectar amiloidose. Além de marcar amiloidose, a ThT liga-se a matrix da cartilagem, fibras elásticas e mucopolissacarídeos [54].

Devido a especificidade da ThT em se ligar a fibrila de amiloidose, foram encontradas varias aplicações como diagnóstico de amiloidose em secções de tecidos usando microscopia de fluorescência [100].

Em trabalhos recentes, a tioflavina T é utilizada para detectar amiloidose- β *in vivo* usando um derivado sem carga da ThT, pois esse consegue penetrar no cérebro [101].

Griffin e colaboradores [11] mostraram um aumento na emissão fluorescente ThT na presença de soro humano, demonstrando que a ThT pode ser um novo método para avaliação de risco cardiovascular.

3.4 Laser de Pulsos Ultracurtos

Após a invenção do laser na década de 60, a utilização da técnica de travamento de modos, “*mode-locking*”, possibilitou a produção de pulsos da ordem de picossegundos. Na década de 70 o refinamento da técnica na geração desses pulsos e o uso de lasers de corantes que possuíam largas bandas de emissão, encurtaram o pulso para centenas de femtossegundos (10^{-15} s). Em 1985, com a invenção do CPA (Amplificação de Pulsos com

varredura em Frequência) [102] permitiu-se a geração de pulsos ultracurtos de alta intensidade em sistema laser do estado sólido, possibilitando a disseminação desse sistema de laser devido à sua simplicidade de operação quando comparado a outros sistemas laser de geração desses pulsos e relativo preço baixo. O CPA produz uma amplificação da intensidade do feixe de maneira indireta, primeiro ocorre o alargamento do pulso, para ser em seguida amplificado (o sistema amplifica a intensidade mais de mil vezes sem danificar os componentes do sistema) e por fim o pulso é comprimido para uma duração temporal próxima a largura temporal inicial do pulso.

Figura 19 - Módulos básicos de um sistema CPA. [103]

O laser de Titânio-Safira ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$) [104], descoberto no início dos anos 90, fez com que os sistemas lasers de femtossegundos ficassem mais simples e mais confiáveis. As características do laser como enorme largura de banda, ser baseado num meio ativo de estado sólido, e a descoberta dos espelhos de compensação de varredura de frequência possibilitaram a obtenção de pulsos menores que 10 fs centrados em 800 nm, uma potência média de mais de 500 mW e taxa de repetição de centenas de MHz. Os pulsos ultracurtos são gerados a partir da autofocalização que ocorre no meio laser devido à intensidade dos pulsos propagantes, esse efeito foi denominado de “Kerr-lens-modelocking” (KLM).

Os sistemas lasers de pulsos ultracurtos de bancada geram intensidades da ordem de 10^{12} a 10^{18} W/cm^2 , e o campo elétrico associado à onda eletromagnética da ordem de 10^9 – 10^{12} V/m passam a não ser considerados tão pequenos quando comparados com o campo Coulombiano da ordem 10^{11} V/m (para o elétron 1s do átomo de Hidrogênio) responsável pela interação entre o núcleo e o elétron [105]. Dessa forma a interação deixa de ser uma perturbação fraca da matéria irradiada, o elétron interage com o campo elétrico do laser que sobrepõe o campo Coulombiano do átomo, e a absorção do material passa a ser uma absorção não linear. Portanto, quando a intensidade de pulsos ultracurtos atingindo os

elétrons de um material é suficientemente elevada para ultrapassar o campo elétrico ligando os elétrons, ocorre a ionização desses elétrons. Dependendo da densidade dos elétrons livres gerados e da intensidade do feixe de pulsos ultracurtos em amostras sólidas, pode ocorrer a ablação na superfície do material.

Quando a densidade de fótons é alta o suficiente para que um número razoável de elétrons estejam no mesmo sítio de interação espacial e temporal, a absorção multifotônica torna-se possível.

Para analisar a absorção multifotônica estuda-se o gráfico log-log da energia absorvida em função da intensidade. O gráfico pode ser ajustado por uma reta e o cálculo do coeficiente angular fornece a ordem do processo, ou seja, o número de fótons absorvidos durante a irradiação.

Uma das maiores vantagens da utilização do laser de pulsos ultracurtos é a mínima transferência de calor para a amostra, não ocorrendo a excitação de modos vibracionais que podem introduzir ruído ou mesmo mascarar o sinal que está sendo medido.

Com as melhorias na tecnologia de geração de pulsos ultracurtos, os lasers de femtossegundos tornaram-se ferramentas utilizadas para as muitas aplicações, incluindo as médicas e biológicas [106]. Estudos mostraram a dinâmica das proteínas [107], processos intramoleculares, como por exemplo a dinâmica dos elétrons na fotossíntese [108] e também em mecanismos fotoiniciadores de degradação do DNA [109].

Esse estudo irá apresentar a caracterização por meios espectroscópicos da lipoproteína de baixa densidade (LDL) através da análise de emissão dos dois biossensores explicados anteriormente, bem como desenvolver uma nova metodologia para oxidação da partícula de LDL através da irradiação com pulsos ultracurtos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A preparação das soluções foi realizada no Centro de Laser e Aplicações do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares. A Clorotetraciclina e a Tioflavina T foram adquiridas da Sigma Aldrich, o tampão MOPS da Carl Roth, Alemanha, o cloreto de európio hexahidratado da Molecular Probe e a LDL foi processada pela Dra. Andrea Moreira Monteiro no laboratório do Dr. Magnus A. Gidlund do Instituto de Ciências Biomédicas, ICB Universidade de São Paulo.

Os reagentes foram pesados em uma balança analítica com precisão de $1,0 \cdot 10^{-4}$ g. As vidrarias foram devidamente limpas antes da preparação das soluções para evitar a contaminação.

Na Tabela 3 encontram-se os materiais utilizados durante os experimentos e suas respectivas nomenclaturas.

Tabela 3 – Solventes e reagentes utilizados

Reagentes	Nomenclatura
Európio	Eu
Clorotetraciclina	CTc
Ácido propanesulfônico 3 (N-Morpholino)	MOPS
Magnésio	Mg
Cálcio	Ca
Tioflavina T	ThT
Água bi-deionizada	H ₂ O
Triptofano	Trip
Lipoproteína de Baixa Densidade	LDL
Lipoproteína de Baixa Densidade modificada com íons de Cobre	CuLDL
Lipoproteína de Baixa Densidade modificada com íons de Ferro	FeLDL
Lipoproteína de Baixa Densidade modificada com pulsos ultracurtos	fs-LDL

4.1 Preparação Biomarcadores

4.1.1 Complexo EuCTc

Os materiais utilizados, Cloridrato de Európio Hexahidratado ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e Cloridrato de Clorotetraciclina ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8$) foram obtidos da Sigma Aldrich com grau analítico.

Solução I: Solução tampão de MOPs ácido 3-(N- morfolino)-propanossulfônico, 2.09 g de sal MOPs em 1000 mL de água bideionizada (o pH foi ajustado para 6.9);

Solução II: $31,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Eu^{3+} ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em 10 mL da solução I;

Solução III: $21 \mu\text{mol L}^{-1}$ de solução de clorotetraciclina em 10 mL da solução I;

Solução IV: solução de EuCTc: Misturou-se 10 mL da solução II, 10 mL da solução III e completou com MOPs até 100 mL;

Solução V: EuCTc:LDL (500 μL de EuCTc + 10 μL de LDL).

Todas as amostras foram feitas em triplicata. As medidas de emissão fluorescente das amostras foram feitas com comprimento de onda de excitação de 390 nm e a emissão foi observada em 617 nm.

4.1.2 Interferente

Para preparação do interferente utilizou-se a concentração encontrada no plasma sanguíneo.

Solução VI: $1,12 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água bideionizada.

Solução VII: $0,75 \text{ mM}$ de Mg^{3+} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água bideionizada.

Solução VIII: 500 μL de EuCTc + 500 μL da Solução VI ou Solução VII + 10 μL de LDL.

4.1.3 Tioflavina T

A Tioflavina T ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{S}$) foi obtida da Sigma Aldrich com grau analítico.

Solução IX: solução de Tioflavina foi preparada com concentração de $8 \mu\text{M}$ em 100 mL de água bideionizada e armazenada em geladeira.

Solução X: ThT:LDL (500 μ L de ThT + 20 μ L de LDL). Todas as amostras foram feitas cinco vezes. As medidas de emissão fluorescente foram realizadas com comprimento de onda de excitação de 450 nm, com emissão em 480 nm.

4.2 Protocolo para separação da LDL

A LDL utilizada nesse trabalho foi extraída de bolsas de plasma obtidas de doadores saudáveis do COLSAN (Associação Beneficente de Coleta de Sangue). A separação foi feita através do seguinte protocolo: ao plasma foi adicionado gentamicina benzamidina (2 mM), (0,5%), cloranfenicol (0,25%), PMSF (fenil-metil-sulfonifluoreto) (0,5 mM) e aprotinina (0,1 unidades / mL). A LDL foi isolada por ultracentrifugação sequencial de 105g, a 4 ° C, utilizando-se 75 Ti rotor (Beckman Instruments). Após a ultracentrifugação a LDL foi filtrada através de filtro de 0,22 μ m e dialisada por 48 h. A concentração da LDL foi quantificada através de um kit BCA (PIERCE) conforme instruções do fabricante.

4.2.1 Oxidação da LDL com íons de Cobre

Para obter as amostras de LDL oxidadas com íons de cobre, a LDL dialisada foi incubada com 20 μ M de CuSO_4 por 18h à 37°C. A oxidação foi finalizada com a adição de EDTA (1mM) [6].

4.2.2 Oxidação da LDL com íons de Ferro

A oxidação da LDL com íons de Ferro foi feita através da diálise da solução de LDL em 2 μ M de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em PBS pH 7,2, por 48 h em temperatura ambiente protegido da luz. A oxidação foi finalizada com a adição de EDTA (1mM) [7].

4.3 Absorção e emissão óptica

As medidas de absorção foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Varian Cary 5000 em temperatura ambiente. As medidas foram realizadas com uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. As amostras foram analisadas na região de 200 a 600 nm.

As medidas de fluorescência foram realizadas com o fluorímetro, Fluorolog 3, da Horiba Jobin Yvon. As medidas foram feitas a temperatura ambiente e utilizou-se sempre cubetas com 1mm de caminho óptico com as quatro faces polidas. A excitação das

amostras foi feita através de uma lâmpada de Xenônio (Xe) de 450 Watts, a velocidade de leitura foi de 150 nm/s. O aparelho apresenta duas grades uma de 330 (200 – 700 nm) e uma de 500 nm (300 – 1000 nm). Os espectros de emissão foram analisados através do software FluorEssence.

4.4 Tempo de vida do íon Európio no complexo EuCTc

As medidas de tempo de vida do Európio no complexo EuCTc foram realizadas no Centro de Lasers e Aplicações do IPEN no laboratório do Dr. Laércio Gomes.

As medidas do tempo de vida das amostras de EuCTc:LDL e EuCTc:CuLDL foram feitas com um sistema de excitação que utiliza um oscilador paramétrico óptico ajustável (OPO de OPOTEK) bombeado pelo segundo e terceiro harmônicos de um laser Nd-YAG Q-switched da Quantel, com duração temporal de 4 ns e taxa de repetição de 10 Hz. Os tempos de vida foram detectados por uma fotomultiplicadora S-20 e analisados usando amplificador de sinal em evolução temporal (PAR 4402), e osciloscópio digital de 200 MHz Tektronix TDS 410. As amostras foram excitadas com comprimento de onda de 423 nm e a emissão foi obtida em 617 nm, utilizou-se uma cubeta de plástico de 1 cm de caminho óptico. Para as medidas de tempo de vida utilizou-se 500 µL de EuCTc para medir o tempo de vida do íon Európio no complexo e 500 µL de EuCTc + 10 µL de LDL para medir o tempo de vida do íon Európio na presença da LDL.

O tempo de vida é descrito por uma exponencial dupla:

$$y = y_0 + B_1 e^{\frac{t}{\tau_1}} + B_2 e^{\frac{t}{\tau_2}} \quad \text{Equação 2}$$

O tempo de vida médio $\langle \tau \rangle$ foi calculado de acordo com:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum b_i \tau_i^2}{\sum b_i \tau_i} \quad \text{Equação 3}$$

4.5 Tempo de vida do Triptofano nas amostras de LDL

As medidas de tempo de vida do triptofano presente nas amostras de LDL foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Amando Siuiti Ito no Departamento de Física da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, – Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto.

O tempo de vida do triptofano nas soluções de LDL foi obtido utilizando um aparelho baseado na técnica de fótons correlacionados no tempo único de contagem. A fonte de excitação foi um laser titânio-safira Tsunami 3950 Spectra Physics, bombeado por um laser de Spectra X Millenia estado sólido, com taxa de repetição de pulso fixado a 4,0 MHz usando selecionador de pulso 3980 Spectra Physics. O espectrômetro foi fixado em formato L de configuração, o comprimento de onda de emissão foi selecionado por um monocromador, e fótons emitidos foram detectados por uma fotomultiplicadora R3809U Hamamatsu refrigerada. A FWHM da função de resposta do instrumento foi tipicamente 100 ps, e as medições foram feitas usando resolução temporal de 12 canais por ps. Software da Edinburgh Instruments foi utilizado para analisar os decaimentos individuais, que foram montados em curvas multi-exponenciais. A qualidade do ajuste foi julgada pela análise de reduzida χ^2 e fiscalização da distribuição de resíduos.

O tempo de vida é descrito por uma exponencial tripla:

$$y = y_0 + B_1 e^{\frac{t}{\tau_1}} + B_2 e^{\frac{t}{\tau_2}} + B_3 e^{\frac{t}{\tau_3}} \quad \text{Equação 4}$$

O tempo de vida médio $\langle \tau \rangle$ foi calculado de acordo com:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum b_i \tau_i^2}{\sum b_i \tau_i} \quad \text{Equação 5}$$

4.6 Anisotropia do Triptofano nas amostras de LDL

Os perfis de decaimento de anisotropia foram feitos usando um aparato baseado no contagem de fóton único correlacionado no tempo. A fonte de excitação utilizada foi um Tsunami 3950 da Spectra Physics pulso selecionador. O laser foi ajustado de modo que um cristal gerador BBO de terceiro harmônico (GWN-23PL Spectra Physics) originou os pulsos de 295 nm, que foram direcionados para um espectrômetro da Edinburgh FL900. O espectrômetro foi fixado em formato L de configuração, o comprimento de onda de emissão foi selecionado por um monocromador, e fótons emitidos foram detectados por uma fotomultiplicadora R3809U Hamamatsu refrigerada. Para os experimentos de anisotropia foram utilizados um compensador Soleil-Babinet no feixe de excitação e um polarizador Glann-Thomson no feixe de emissão. A FWHM da função de resposta do instrumento foi tipicamente 100 ps, e as medições foram feitas usando resolução temporal

de 12 canais por ps. Software fornecido pela Edinburgh Instruments foi utilizado para analisar os decaimentos individuais, que foram montados em curvas multi-exponenciais. A qualidade do ajuste foi julgada pela análise de reduzida χ^2 e fiscalização da distribuição de resíduos. As curvas multi-exponenciais foram ajustadas apartir de:

$$r(t) = \sum_i A_i \cdot e^{\frac{-t}{\tau_i}} + A_\infty \quad \text{Equação 6}$$

4.7 Irradiação da LDL com laser de pulsos ultracurtos

4.7.1 Irradiação com laser

As irradiações com lasers de pulsos ultracurtos foram realizadas no Centro de Lasers e Aplicações do IPEN no laboratório do Dr. Ricardo Elgul Samad.

Amostras de LDL nativas foram irradiadas com pulsos gerados por um sistema de laser de Titânio:Safira CPA (Femtopower Pro Compact da Femtolasers). A duração temporal do pulso, centrado em 785 nm, foi fixada em 25 fs (FWHM), a taxa de repetição foi de 4 kHz e as energias na faixa entre 200 e 750 μJ , resultando em potência de pico de 8-30 GW. O feixe de pulsos incidente sobre a amostra apresentava um diâmetro de cerca de 4 mm. Utilizou-se uma cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico contendo 1 mL solução de LDL. O feixe de laser iluminou todo o volume da solução. As irradiações foram feitas em 22°C, seguida de armazenamento de amostras em geladeira e proteção contra luz ambiente até que as medidas seguintes fossem realizadas.

Figura 20 - Irradiação da solução de LDL com laser de pulsos ultracurtos.

4.7.2 Quantificação alfatocoferol

A quantificação do alfatocoferol foi realizado no Instituto de Química no laboratório da Dra. Sayuri Miyamoto, na Universidade de São Paulo – Campus São Paulo.

A quantificação da vitamina E (alfatocoferol) foi feita seguindo a metodologia proposta por Hatam & Kayden [110]. Utilizou-se uma curva padrão de δ -tocoferol 20 μ M como padrão interno, e após a preparação da amostra utilizou-se 10 μ L para quantificar a concentração do alfatocoferol presente nas amostras de LDL irradiadas. A análise foi feita por HPLC, com uma coluna de fase reversa C8 Luna com dimensões de 150 x 4.6mm e 5 μ m de tamanho de partícula; Metanol (fase orgânica) e H₂O (fase aquosa) como fase móvel, isocrático em 93%. A excitação da molécula foi feita em 295nm e a emissão analisada em 352nm. Após injetadas as amostras e a curva padrão, fez-se a quantificação das áreas dos picos do α -tocoferol em relação à área do pico do padrão interno.

4.7.2 Peroxidação Lipídica

As medidas de peroxidação lipídica foram realizadas no Instituto de Ciências Biomédicas da USP no laboratório do Dr. Magnus Gidlung.

Dienos Conjugados: A quantificação dos dienos conjugados foi feita através da absorção em 234 nm. Para a medida foi utilizada uma placa de 96 poços de quartzo, colocou-se 50 μ L de LDL em cada poço e a medida de absorbância foi feita através de um espectrofotômetro (GENIOS TECAN, Áustria).

TBARS: A medida do TBARS (teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico) foi feita através da incubação de 50 μ L de amostra com 200 μ L de reagente (1 mL de TCA(ácido tricloroacético), 112,5 mg de ácido tiobarbitúrico, 562,5 μ L de HCL 2M e 30 mL de água miliQ). Ferveu-se a mistura por 15 min em banho Maria, em seguida centrifugou-se 3 min a 10.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e mediu-se a absorbância em 540 nm.

Quantificação de hidroperóxidos lipídicos: O aumento de dienos conjugados é diretamente proporcional ao acúmulo de hidroperóxidos lipídicos, portanto através da absorção em 234 nm dos dienos conjugados é possível quantificar a concentração de hidroperóxidos lipídicos [111]. A quantificação dos hidroperóxidos foi obtida através da Equação 7:

$$\Delta[LOOH] = 2,05 \frac{\Delta A_{234}}{\epsilon_{cd}} \quad \text{Equação 7}$$

onde $\Delta[LOOH]$ é a variação na concentração dos hidroperóxidos lipídicos, ΔA_{234} é a diferença entre a absorbância em 234 nm da LDL Nativa e a LDL oxidada e ϵ_{cd} é o coeficiente de extinção de dienos conjugados.

Os dados da detecção de dienos conjugados, hidroperóxidos lipídicos e TBARS foram analisados pelo teste ANOVA one way e verificou-se as diferenças estatísticas através de testes de comparações múltiplas ($p < 0,05$).

4.7.3 Cromatografia de exclusão molecular ou gel de filtração

O FPLC de exclusão molecular foi feito utilizando uma coluna de Superdex 200 HR em um sistema de FPCL da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). A coluna foi estabilizada com PBS 0,05 M. As amostras de LDL foram diluídas em água MiliQ para uma concentração de 1 mg.mL^{-1} , injetou-se na coluna 500 μL da amostra. A leitura foi feita com fluxo contínuo $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ de PBS 0,05 M. Foi mensurado a absorbância da amostra em 280 nm com um detector “Diode Array” (Shimadzu®, Japão).

4.7.4 Eletroforese

A medida de eletroforese foi feitas com gel de agarose 0,6% em TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) com pH 8.0. A eletroforese foi feita com a LDL Nativa, FeLDL, CuLDL e fs-LDL irradiada com três energias diferentes (300 μJ , 500 μJ e 750 μJ). Para a corrida utilizou-se 22,5 μL de amostra em 2,5 μL de tampão de amostra. Dessa mistura foram utilizados 20 μL de solução em cada poço. Utilizou-se uma voltagem de 60 V e o tempo de corrida foi de 2 h. Após a corrida o gel foi corado com Comassie blue por 20 min e em seguida descorado. O gel foi armazenado na estufa para secagem por 24 horas.

4.7.5 Microscopia eletrônica de transmissão

As medidas de microscopia eletrônica de transmissão foram feitas no Instituto Butantã com a Dra. Sylvia Mendes Carneiro.

Para as medidas de microscopia eletrônica de transmissão das partículas de LDL foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Germany), sendo as

imagens capturadas pela câmera Megaview III e processadas pelo software iTEM – Universal TEM Imaging Platform (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Germany). Para as análises empregou-se malhas quadradas de cobre (com filme de parlódio e carbono amorfo), no qual a largura de cada quadrado é de 37 μm (especificação G400-Cu "400 mesh"). Nestas malhas pipetou-se 5 μL de amostra, retirando o excesso com papel absorvente e então foram obtidas as imagens.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Biossensor EuCTc

Na primeira etapa estudou-se o comportamento do complexo EuCTc na presença da LDL Nativa, e oxidada. Para isso, utilizou-se soluções de LDL provenientes de bolsas de plasma, fornecidas pelo COLSAN.

Primeiro estudou-se o espectro de absorção da Clorotetraciclina, do EuCTc e do EuCTc na presença da LDL Nativa ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). Na Figura 21 observa-se que a banda da clorotetraciclina apresenta um deslocamento no pico de absorção, o que comprova a complexação com o íon Európio, já na presença da LDL nativa o complexo EuCTc não apresenta deslocamento na banda de absorção, quando comparado ao complexo EuCTc puro.

A partir do espectro de absorção, escolheu-se o comprimento de onda de excitação, $\lambda = 400 \text{ nm}$. Em seguida, estudou-se qual a melhor razão molar entre o Európio e a Clorotetraciclina na presença da LDL. Para isso obteve-se o espectro de emissão com diferentes razões molares para o complexo na presença de uma quantidade fixa de LDL ($10 \mu\text{L}$) com concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. O espectro pode ser observado na Figura 22.

Figura 21 - Espectro de absorção da clorotetraciclina, do complexo EuCTc e do complexo EuCTc na presença da LDL Nativa.

Figura 22 - Espectro de emissão do complexo EuCTc com diferentes razões molares na presença da LDL Nativa.

A melhor razão molar para o complexo na presença da LDL Nativa é 1,5 Eu: 1,0 de CTc. O resultado obtido está de acordo com estudos anteriores do grupo [13]. A formação do complexo EuCTc não completa o número de coordenação do íon Európio que normalmente são oito, o que gera uma carga positiva relativa ao número de coordenação incompleto do íon Európio [112]. Portanto quando colocado em presença das partículas de LDL ocorre uma maior atração entre o íon Európio e grupamentos da partícula de LDL que estiverem com uma carga negativa, como por exemplo hidroxilas e grupos fosfatos presentes na superfície da LDL. Dessa forma ocorre uma maior blindagem do íon Európio com relação as moléculas de água, diminuindo as perdas não radioativas e consequentemente aumentando a emissão do íon Európio.

Para dar continuidade ao estudo da emissão do complexo EuCTc na presença da LDL e estudando o processo de separação da LDL, viu-se que essa passa por uma diálise de 48 hrs em solução tampão. Neste processo, a LDL é colocada em uma membrana semipermeável fixada por duas presilhas, mergulhada na solução tampão e deixada protegidas da luz ambiente e em geladeira. Dependendo do protocolo seguido, pode-se utilizar como solução tampão o PBS (Tampão Fosfato-Salino), PBS + EDTA (Tampão Fosfato-Salino + Ácido Etilenodiaminotetracético) ou TRIS (tris (hidroximetil)-aminometano).

Para estudar a influência da diálise da LDL na emissão do complexo EuCTc, a LDL foi separada conforme protocolo descrito em materiais e métodos e dividida em 4 grupos:

LDL não dialisada, LDL dialisada em PBS, LDL dialisada em PBS+EDTA e LDL dialisada em TRIS. A concentração da LDL foi quantificada com kit BCA (PIERCE) sendo de 2 mg.mL^{-1} .

Na Figura 23 é possível notar que a emissão do Európio no complexo foi a mesma quando a LDL não foi dialisada, dialisada em PBS e dialisada em PBS + EDTA. Contudo, quando a mesma foi dialisada em TRIS a emissão do complexo diminuiu, provavelmente o TRIS diminuiu a emissão do Európio, não sendo um bom tampão para dialisar a LDL para essas análises. O TRIS só é utilizado para dialisar a LDL quando se utiliza o protocolo para retirar LDL eletronegativa por HPLC [37].

Figura 23 - Espectro Emissão EuCTc:LDL (diferentes diálises).

Observou-se que o PBS aumenta a emissão do complexo EuCTc, conforme mostrado na Figura 24 mas quando a LDL foi dialisada com PBS ou PBS + EDTA esse não influenciou na emissão do mesmo, sendo o sinal intensificado devido somente as partículas de LDL. Portanto pode-se prosseguir as medidas com a LDL dialisada com os tampões comumente utilizados, sem influência na emissão do complexo.

Figura 24 - Espectro de emissão do complexo EuCTc com e sem PBS.

Para estudar o comportamento do complexo EuCTc na presença da LDL, foi obtida a curva de calibração do complexo na presença de diferentes concentrações de LDL nativa.

A LDL foi separada através de ultracentrifugação a partir das bolsas de plasma doadas pelo COLSAN. Para o estudo do comportamento do complexo EuCTc com diferentes concentrações de LDL utilizou-se uma bolsa de plasma. Após a separação da LDL nativa foi obtida a concentração através do Kit comercial kit BCA (PIERCE) conforme instruções do fabricante e em seguida variou-se a concentração das soluções de LDL obtendo assim sete concentrações diferentes. As amostras dos complexos foram preparadas utilizando 500 μ L dos complexos acrescidos de 10 μ L de LDL. As amostras ficaram em repouso por 15 minutos antes de realizar as medidas de emissão. As medidas de emissão foram realizadas excitando as amostras nos comprimentos de onda de 400 nm e a emissão obtida em 617 nm, o espectro de emissão e a curva de calibração podem ser observados na Figura 25 e Figura 26.

Figura 25 - Emissão do EuCTc:LDL nativa.

Figura 26 - Curva de calibração EuCTc:LDL nativa.

A partir da Figura 25 foi obtida a curva de calibração (Figura 26) do EuCTc:LDL, através do cálculo da área integrada do gráfico da intensidade de emissão em função do comprimento de onda. Para o cálculo da área integrada selecionou-se o intervalo de 500 nm até 720 nm, e o valor foi obtido pelo software Origin 8.5[®], foram calculados três valores de área e feito a média das áreas e o respectivo desvio padrão.

Na Figura 26 é possível observar que a área do espectro de emissão do Európio no complexo EuCTc aumenta linearmente em função do aumento da concentração da LDL nativa, sendo possível descrever uma equação linear $y = a + bx$, com $a = (1,83 \pm 0,53) \cdot 10^7$

e $b = (1,16 \pm 0,06) \cdot 10^7$. O ajuste linear apresentou um valor para o ajuste do R-Quadrado de 0,98.

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas, constitui o limite de detecção. Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a fórmula $LD = \frac{3\sigma}{b}$ onde σ é a incerteza da medida e b é o coeficiente angular da reta, obtida através de regressão linear com o auxílio do software Origin 8.5[®], e o limite de quantificação foi obtido através da fórmula $LQ = \frac{10\sigma}{b}$, onde σ é a incerteza da medida e b é o coeficiente angular da reta [113]. O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas.

Para o complexo EuCTc + LDL Nativa foram obtidos os seguintes limites: $LD = 0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $LQ = 0,52 \text{ mg.mL}^{-1}$. A partir desses limites pode-se dizer que o complexo EuCTc é um bom biossensor para quantificação da LDL nativa, sendo essa encontrada em maior quantidade no plasma humano quando comparada com a LDL em seu estado oxidado.

A LDL pode ser oxidada *in-vitro* a partir da interação com íons metálicos. Desta forma as duas oxidações, com ferro e com cobre foram utilizadas para estudar o comportamento do complexo EuCTc na presença de diferentes níveis de oxidação da partícula da LDL.

Para estudar o complexo EuCTc na presença da LDL oxidadas com íons de Ferro, prepararam-se dez amostras do complexo EuCTc + FeLDL. Utilizou-se 500 μL de EuCTc com 10 μL de FeLDL, as amostras permaneceram em repouso por 15 minutos. As medidas de emissão foram feitas excitando a amostra com 400 nm e o espectro de emissão pode ser observado na Figura 27. As medidas foram feitas em triplicata, e a partir do espectro de emissão foram calculados os valores das áreas integradas conforme feito para a LDL nativa. Em seguida, traçou-se a curva de calibração como mostrado na Figura 28.

Figura 27 - Espectro de emissão do EuCTc:FeLDL.

Figura 28 - Curva de calibração EuCTc:FeLDL.

A Figura 27 mostra o espectro de emissão do complexo EuCTc:FeLDL e na Figura 28 sua curva de calibração. É possível observar que o aumento da concentração da FeLDL é acompanhada do aumento da área do espectro de emissão do Európio no complexo através de uma relação linear, sendo possível escrever uma equação da forma $y = a + bx$ $a = (5,10 \pm 0,51) \cdot 10^6$ e $b = (1,22 \pm 0,75) \cdot 10^7$. O ajuste apresentou um valor de R-Quadrado igual a 0,98. Para os valores de limite de detecção e limite de quantificação foram obtidos os seguintes valores: $LD = 0,18 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $LQ = 0,61 \text{ mg.mL}^{-1}$. Na Figura 28 observa-se que a partir de uma concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ocorre uma saturação na área do espectro de emissão do complexo, isso ocorre provavelmente porque o íon Európio encontra-se totalmente envolvido por partículas de FeLDL, isolando assim o íon das moléculas de

água, e o aumento na quantidade de partículas já não resulta em aumento de emissão do Európio.

Com isso, da mesma forma que foi realizada com a LDL oxidada com íons de Ferro, obteve-se o espectro de emissão e a curva de calibração para o complexo na presença da LDL oxidada com íons de Cobre.

O espectro de emissão do EuCTc:CuLDL é mostrado na Figura 29, e a partir dessa foi obtida a curva de calibração mostrada na Figura 30. A relação entre a concentração da CuLDL é linear com o aumento da área de emissão do complexo EuCTc, obedecendo a relação linear $y = a + bx$, com $a = (6,90 \pm 0,17) \cdot 10^6$ e $b = (1,482 \pm 0,065) \cdot 10^7$. O ajuste apresentou um valor de R-Quadrado igual a 0,97. Os valores para o limite de detecção e quantificação foram: LD = $0,13 \text{ mg.mL}^{-1}$ e LQ = $0,44 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Figura 29 - Espectro de emissão EuCTc:CuLDL.

Figura 30 - Curva de calibração EuCTc:CuLDL.

Sabe-se que na presença de íons interferentes a emissão do complexo EuCTc com a CuLDL apresenta um maior aumento na emissão do íon Európio quando comparada com a emissão do íon no complexo EuCTc sem o íon interferente [13].

Para dar continuidade no estudo do complexo EuCTc com o íon interferente na presença da LDL oxidada, obteve-se a curva de calibração do complexo EuCTc:Ca + CuLDL para estudar se a relação de aumento da concentração da CuLDL geraria um aumento linear na área de emissão do complexo EuCTc:Ca.

As amostras dos complexos foram preparadas utilizando 500µL dos complexos acrescidos de 10µL de LDL oxidada e 500µL de íons inorgânicos, neste caso Cálcio, correspondendo à concentração normalmente encontradas no plasma sanguíneo (1,12 µM). As amostras ficaram em repouso por 15 minutos antes de realizar as medidas de emissão. As medidas de emissão foram realizadas excitando as amostras nos comprimentos de onda de 400 nm.

Figura 31 - Espectro de emissão EuCTcCa:CuLDL

Figura 32 - Curva de calibração EuCTcCa:CuLDL.

A Figura 31 mostra o espectro de emissão do EuCTcCa na presença de diferentes concentrações de CuLDL. Na presença do íon interferente a curva de calibração, mostrado na Figura 32 para o complexo EuCTcCa:CuLDL apresenta uma relação linear representada pela equação linear $y = a + bx$, com $a = (3,03 \pm 0,31) \cdot 10^6$ e $b = (8,28 \pm 0,27) \cdot 10^6$ com $LD = 0,10 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $LQ = 0,32 \text{ mg.mL}^{-1}$. O ajuste apresentou um valor de R-Quadrado de 0,99. Novamente observa-se uma saturação no sinal de emissão para concentrações superiores à $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Comparando-se as curvas de calibração da ox-LDL (FeLDL, CuLDL é possível notar uma semelhança nas curvas, todas apresentam um início de saturação no sinal de emissão do íon Európio no complexo EuCTc. Entretanto os valores de concentrações iniciais de

saturação são diferentes, para a curva de calibração para FeLDL a saturação inicia-se a partir de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, já para a CuLDL a saturação inicia-se com um valor inferior $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, quando comparada com a FeLDL.

Sabe-se que a oxidação promovida pelos íons de Ferro na partícula de LDL é mais branda do que a oxidação promovida por íons de Cobre [114]. Portanto, a oxidação por íons de Ferro promove uma menor modificação na proteína apoB-100 e portanto apresenta uma menor tendência em formar fibrilas, o que promoveria uma menor blindagem do íon Európio das moléculas de água. Já a CuLDL apresenta uma maior formação de fibrilas, pois promove uma maior modificação na parte proteica da LDL. Portanto gera assim uma maior blindagem do íon Európio e uma saturação no sinal de emissão a partir de uma concentração menor de CuLDL.

Analizando os valores dos limites de detecção e quantificação mostrados na Tabela 4 nota-se que o complexo EuCTc apresenta limites de detecção e quantificação baixos para analisar a LDL nativa e oxidada. Isso mostra que o EuCTc é um biossensor com alta sensibilidade.

Quando complexado com a LDL nativa o EuCTc não apresentou uma saturação no sinal de emissão. Já para a LDL oxidada tanto uma oxidação mais branda (FeLDL), quanto uma oxidação mais forte (CuLDL) apresentaram uma saturação no sinal de emissão. Os resultados obtidos através das curvas de calibração mostram que o complexo EuCTc é um bom biossensor para quantificar a LDL.

Foi observado que em algumas medidas, como as apresentadas na Figura 25, Figura 28 e Figura 31, o pico de emissão do európio se mostrou deformado. Dois fatores podem explicar este resultado:

- 1) Mudanças nos sítios de ocupação do Európio na molécula de Clorotetraciclina, intermediada pela LDL;
- 2) Processo de autoabsorção.

O segundo processo parece ser a explicação mais correta, uma vez que se nota uma grande absorção de luz na superfície de contato com a cubeta. Vale ressaltar que este efeito é desprezível na parte linear da curva de calibração.

Tabela 4- Valores dos Limites de Detecção e Quantificação para o complexo EuCTc na presença da LDL Nativa, e oxidada.

	Limite de Detecção (mg.mL ⁻¹)	Limite de Quantificação (mg.mL ⁻¹)	Saturação no sinal de Emissão
EuCTc + LDL Nativa	0,16	0,52	Não
EuCTc + FeLDL	0,18	0,61	2,5 mg.mL ⁻¹
EuCTc + CuLDL	0,13	0,44	1,5 mg.mL ⁻¹
EuCTcCa + CuLDL	0,10	0,32	1,5 mg.mL ⁻¹

Para estudar com mais detalhes a emissão do complexo EuCTc na presença da LDL mediu-se o tempo de vida do íon Európio na presença de diferentes concentrações de LDL nativa (Figura 33), na presença de CuLDL (Figura 34).

Figura 33 - Tempo de vida do íon Európio na presença de diferentes concentrações de LDL.

Figura 34 - Tempo de vida do íon Európio na presença de diferentes concentrações de CuLDL.

O tempo de vida do Európio no complexo EuCTc não se comporta como uma exponencial simples, mas sim como uma exponencial dupla com dois tempos de decaimento que pode ser representada pelas Equação 2 .

$$y = y_0 + B_1 e^{\frac{t}{\tau_1}} + B_2 e^{\frac{t}{\tau_2}} \quad \text{Equação 2}$$

onde, B_1 e B_2 são os fatores pré-exponenciais, e τ_1 e τ_2 são os tempos de decaimentos. E através dos tempos decaimento e dos fatores pré-exponenciais pode-se calcular o tempo de decaimento médio com a Equação 3:

$$\tau_m = \frac{\sum_i B_i \tau_i^2}{\sum_i B_i \tau_i} \quad \begin{array}{l} \text{Equação 3} \\ \text{Equação} \end{array}$$

Através da Equação 2 e Equação 3 foi possível calcular o tempo de vida de decaimento do Európio no complexo EuCTc na presença da LDL nativa e CuLDL, respectivamente.

Tabela 5 - Tempo de vida do Európio no complexo EuCTc:LDL Nativa.

LDL Nativa		
	Tempo de vida (μ s)	Desvio Padrão
EuCTc	7,5	0,5
EuCTc:LDL (0,5 mg.mL ⁻¹)	15,16	0,4
EuCTc:LDL (1,0 mg.mL ⁻¹)	15,22	0,3
EuCTc:LDL (1,5 mg.mL ⁻¹)	23,24	0,3
EuCTc:LDL (2,0 mg.mL ⁻¹)	24,21	0,2
EuCTc:LDL (2,5 mg.mL ⁻¹)	24,61	0,2
EuCTc:LDL (3,0 mg.mL ⁻¹)	25,60	0,3

Na Tabela 5 é possível notar que o tempo de vida do íon Európio na presença da LDL Nativa dobra, isso ocorre porque as moléculas de água são agrupadas em torno das hidroxilas e dos grupos fosfatos da partícula de LDL, isolando o íon Európio, portanto, ocorre uma diminuição da transferência de energia não radioativa para as moléculas de água.

Quando comparado o tempo de vida do complexo EuCTc encontrado nesse trabalho com o tempo de vida em trabalhos anteriores do grupo [13], observou-se que para o presente trabalho ocorreu uma diminuição no tempo de vida do íon Európio. Esse fato pode ter acontecido devido a mudança nos sítios de coordenação do íon Európio na molécula da Clorotetraciclina ocasionado devido ao tempo e condições de armazenagem do complexo ou a ocorrência de algum artefato na preparação do complexo.

Tabela 6- Tempo de vida do Európio no complexo EuCTc:CuLDL.

CuLDL	Tempo de vida (μ s)	Desvio Padrão
EuCTc	7,5	0,5
EuCTc:CuLDL (0,5 mg.mL ⁻¹)	19,8	0,5
EuCTc:CuLDL (1,0 mg.mL ⁻¹)	44,1	0,2
EuCTc:CuLDL (1,5 mg.mL ⁻¹)	44,2	0,3
EuCTc:CuLDL (2,0 mg.mL ⁻¹)	44,4	0,2
EuCTc:CuLDL (2,5 mg.mL ⁻¹)	44,5	0,5
EuCTc:CuLDL (3,0 mg.mL ⁻¹)	45,1	0,5

Na Figura 34 e na Tabela 6 observam-se o espectro de decaimento do tempo de vida do íon Európio na presença da CuLDL e os valores de tempo de vida obtidos respectivamente. Na presença da CuLDL o tempo de vida do íon Európio apresenta o dobro do valor do tempo de vida do íon na presença da LDL nativa, isso ocorre porque as estruturas semelhantes as fibrilas de amiloidose [16], presentes na oxidação da LDL,

promovem um maior isolamento do íon das moléculas de água, apresentando assim um maior tempo de vida de emissão.

Para estudar essa blindagem do íon Európio pelas partículas de LDL fez-se uma aproximação para o cálculo da taxa do fator de supressão (S) para íon Európio. Considerando R_0 a taxa de decaimento para o complexo EuCTc $R_0 = 1/\tau_{\text{EuCTc}}$, e R_1 a taxa de decaimento do EuCTc na presença da LDL $R_1 = 1/\tau_{\text{EuCTc:LDL}}$, é possível obter uma aproximação para a blindagem gerada pelas partículas de LDL em volta do íon Európio, através da relação:

$$S = \frac{R_0 - R_1}{R_0} \quad \text{Equação 8}$$

Se $S = 0$ significa que $R_0 = R_1$, ou seja a LDL não blindar o íon Európio das moléculas de água. Se S for próximo de 1 significa que a partícula de LDL promove uma blindagem do íon Európio. Quanto mais próximo de 1 menos o íon Európio perde energia para as moléculas de água.

Para os valores obtidos nesse experimento para uma concentração de LDL de 1,5 mg.mL⁻¹ o fator de supressão foi de 0,670, mostrando que a partícula de LDL, diminui a perda de energia para molécula de água. E para o complexo na presença da LDL oxidada o valor para o fator de supressão é de 0,830 mostrando que a partícula de LDL oxidada gera uma maior blindagem em torno do íon Európio.

5.2 Tioflavina T

A seguir é apresentado o estudo da ThT com a LDL em seu estado nativo e oxidado. A literatura indica que o comprimento de onda de excitação do corante ThT utilizado para marcar as fibrilas de amiloidose é de 450 nm, pois a banda de absorção na presença das fibrilas sofre um deslocamento de 400 nm para 450 nm [99]. Para estudar o comportamento do corante na presença das partículas de LDL os trabalhos também utilizam esse mesmo comprimento de onda de excitação [11],[16]. Portanto, nesse primeiro estudo da ThT na presença da LDL utilizou-se também 450 nm como comprimento de onda de excitação.

Para o estudo da emissão fluorescente da Tioflavina T, utilizou-se uma cubeta de vidro de caminho óptico de 1 mm. As amostras foram excitadas com 450 nm e a emissão

foi observada em 480 nm. Para complexar com a LDL foram utilizados 500 μL de ThT com 20 μL de LDL, as soluções foram mantidas em repouso por 15 minutos antes da obtenção do espectro de emissão. As medidas foram repetidas cinco vezes.

Estudou-se os espectros de emissão do corante ThT na presença da LDL Nativa e em diferentes níveis de oxidação, e a partir do cálculo da área integrada da emissão do corante em função do comprimento de onda foram traçadas as curvas de calibração da ThT na presença da LDL nativa, LDL oxidada com Cobre e LDL oxidada com Ferro.

Primeiro estudou-se o comportamento do corante na presença da LDL nativa. A Figura 35 mostra o espectro de emissão do corante na presença de diferentes concentrações de LDL e a Figura 36 a curva de calibração para ThT na presença da LDL nativa.

Figura 35- Espectro de emissão ThT:LDL nativa.

Figura 36 - Curva de calibração ThT:LDL nativa.

Nas Figura 35 e Figura 36 nota-se que o aumento na área de emissão fluorescente do corante ThT na presença da LDL nativa obedece a uma relação linear com o aumento da concentração da LDL. A reta mostrada na Figura 36 pode ser descrita por uma equação de reta $y = a + bx$, com $a = (7,11 \pm 0,21) \cdot 10^6$ e $b = (1,991 \pm 0,032) \cdot 10^7$. O ajuste apresentou um valor para R-Quadrado de 0,99. O limite de detecção foi de $LD = 0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o limite de quantificação de $LQ = 0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$.

O espectro de emissão da ThT na presença da LDL nativa (Figura 35) apresenta um aumento na emissão quando comparado com a ThT sozinha. Isso ocorre possivelmente devido a uma atração da molécula de ThT com a partícula de LDL nativa, não permitindo que a molécula de ThT perca energia passando para seu estado excitado TICT, apresentando assim um aumento no sinal de emissão. Com o aumento da concentração de LDL, ocorre uma maior atração com as moléculas de ThT e portanto um maior aumento na emissão do corante. Para as concentrações utilizadas nesse trabalho não foi possível observar uma saturação no sinal de emissão da ThT na presença da LDL nativa.

Para estudar a interação do corante com as partículas de LDL em seu estado oxidado, estudou-se a emissão do corante na presença da CuLDL em diferentes concentrações, conforme mostrado na Figura 37.

Figura 37 - Espectro de emissão da ThT:CuLDL.

Figura 38 - Curva de calibração ThT:CuLDL.

Conforme mostrado nas Figura 37 e Figura 38, a emissão fluorescente da ThT na presença da LDL oxidada por íons de Cobre também obedece uma relação linear entre a área da do espectro de emissão e concentração de LDL, sendo descrita por uma equação linear do tipo $y = a + bx$, com $a = (7,17 \pm 0,01) \cdot 10^6$ e $b = (2,42 \pm 0,04) \cdot 10^7$. O ajuste apresentou um valor de R-Quadrado de 0,99. Os limites de detecção e quantificação foram de $LD = 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $LQ = 0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$. Da mesma forma que obtido para a LDL nativa, não foi observado uma saturação no sinal de emissão do corante na presença da CuLDL.

A Figura 37 mostra que a emissão do corante ThT aumenta com o aumento da concentração a CuLDL. A LDL em seu estado oxidado apresenta a formação de fibrilas semelhantes as fibrilas de amiloidose. A LDL em seu estado oxidado forma a estrutura β -pregueada que leva a modificação lipídica [16], e sabe-se que ThT liga-se a esse tipo de estrutura formada em proteínas modificadas, portanto a ThT liga-se a CuLDL, o que impede a molécula de ThT de passar para seu estado excitado torcido (TICT), o que gera um aumento na emissão do corante.

Comparando-se as duas curvas de calibração do corante na presença da LDL nativa e CuLDL observa-se que na presença da LDL oxidada a ThT apresenta um maior sinal de emissão.

A comparação entre as curvas de calibração pra a LDL nativa e LDL oxidada podem ser observadas na Figura 39 . Como o corante ThT liga-se preferencialmente a fibrilas de amiloidose ou semelhantes a ela, nota-se que a emissão da ThT na presença da ox-LDL é maior a partir de uma concentração superior à $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Esse aumento na emissão deve-se ao início da formação dessas fibrilas semelhantes às fibrilas de amiloidose na LDL oxidada. Portanto o corante ThT pode ser utilizado como um marcador para diferenciar LDL nativa de LDL em seu estado oxidado.

Figura 39 - Comparação curvas de calibração ThT:LDL nativa e ThT:CuLDL.

Para dar continuidade ao estudo do corante ThT na presença da LDL oxidada, analisou-se o sinal de emissão na presença da LDL oxidada por íons de Ferro. Essa abordagem investigou se em um nível de oxidação mais brando que a CuLDL também

ocorreria um aumento no sinal de emissão do corante. Para isso obteve-se o espectro de emissão do corante na presença da FeLDL em diferentes concentrações, nesse caso foram utilizadas seis concentrações diferentes (Figura 40) e traçou-se a curva de calibração a partir da área integrada do sinal de emissão do corante (Figura 41).

Figura 40 - Espectro de emissão da ThT:FeLDL.

Nas Figura 40 e Figura 41 é possível observar o espectro de emissão do corante ThT na presença da FeLDL e a curva de calibração para a mesma. A curva de calibração para ThT:FeLDL obedece novamente uma relação linear sendo descrita pela equação da reta $y = a + bx$, com $a = (5,40 \pm 0,35) \times 10^6$ e $b = (1,840 \pm 0,041) \times 10^7$. O ajuste apresentou um valor de R-Quadrado de 0,99. Com $LD = 0,07 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $LQ = 0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$. Novamente não se observou uma saturação no sinal de emissão do corante para os valores de concentração de FeLDL.

O aumento da emissão do ThT na presença da FeLDL também pode ser explicada pela formação de fibrilas que se ligam a ThT nas partículas de FeLDL, impedindo a perda de energia para o TICT da molécula e com isso ocorre um aumento na emissão do corante.

Figura 41 - Curva de calibração ThT:FeLDL.

Os resultados mostram que o corante ThT pode ser utilizado como um biossensor para quantificação da LDL em seu estado Nativo e Oxidado.

Tabela 7 - Comparação entre os limites de detecção e quantificação para o corante ThT na presença da LDL Nativa e oxidada.

	Limite de Detecção (mg.mL ⁻¹)	Limite de Quantificação (mg.mL ⁻¹)	Saturação no sinal de emissão
ThT:LDL Nativa	0,04	0,15	Não observado
ThT: CuLDL	0,05	0,17	Não observado
ThT:FeLDL	0,07	0,22	Não observado

Comparando os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação (Tabela 7) para a interação da ThT com a LDL, nota-se que a curva de calibração da ThT para LDL nativa apresentou o menor limite de detecção e quantificação, mostrando que o corante ThT apresenta uma boa sensibilidade, e como não observou-se uma saturação no sinal de emissão do corante na presença de altas concentrações de LDL, conclui-se que o corante ThT pode ser utilizado como um biossensor para quantificação da concentração da LDL, e que o corante pode ser utilizado para diferenciar entre LDL nativa e CuLDL.

A Tabela 8 mostra uma comparação dos dois biossensores, EuCTc e ThT a partir dos limites de detecção e quantificação e possível saturação no sinal de emissão. Observa-se que os limites de detecção e quantificação para os dois biossensores utilizados nesse trabalho, o corante ThT apresenta limites de detecção e quantificação inferiores que o complexo EuCTc. Entretanto o complexo EuCTc necessita de menos medidas e apresenta

um pico de emissão mais estreito e bem definido. Vale ressaltar que nas medidas com o sensor EuCTc utiliza-se uma menor quantidade de LDL em cada medida.

Tabela 8 - Comparação entre os limites de detecção e quantificação para os dois biossensores EuCTc e ThT.

	Limite de Detecção (mg.mL⁻¹)	Limite de Quantificação (mg.mL⁻¹)	Saturação no sinal de emissão
EuCTc:LDL Nativa	0,16	0,52	Não
EuCTc:FeLDL	0,18	0,61	2,5mg.mL ⁻¹
EuCTc:CuLDL	0,13	0,44	1,5 mg.mL ⁻¹
EuCTcCa:CuLDL	0,10	0,32	1,5 mg.mL ⁻¹
ThT:LDL Nativa	0,04	0,15	Não
ThT:CuLDL	0,05	0,17	Não
ThT:FeLDL	0,07	0,22	Não

5.3 Quantificação da LDL diretamente no plasma humano.

Na segunda etapa do trabalho estudou-se a possibilidade de utilizar os biossensores EuCTc e ThT para quantificar a LDL diretamente no plasma.

A quantificação da LDL em rotinas laboratoriais é obtida de maneira indireta através de uma equação, conhecida como Fórmula de Friedewald que leva em consideração a concentração do colesterol total, a concentração do colesterol HDL e da concentração dos triglicerídeos. Esta equação, entretanto apresenta algumas limitações quanto a sua utilização, conforme descrito na introdução desta dissertação. Por isso foi feito um estudo para tentar quantificar a LDL diretamente no plasma humano utilizando os dois biossensores o EuCTc e a ThT.

Foi realizada a coleta de sangue de um voluntário em jejum de 12 h com EDTA, o plasma foi separado através de centrifugação e armazenado em geladeira, protegido da luz ambiente. Uma parte do plasma foi utilizado para as análises diretas e outra parte foi utilizada para separação da LDL por ultracentrifugação. Foram feitas as quantificações dos níveis plasmáticos de colesterol total, HDL- colesterol, triglicerídeos, glicemia através dos Kits comumente utilizados em análises laboratoriais para saber se o voluntário apresentava alguma disfunção. A LDL foi quantificada através da Fórmula de Friedewald, os valores obtidos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores obtidos dos níveis plasmáticos de Colesterol Total, HDL, Triglicerídeos, LDL e Glicose.

Constituintes Plasma	Valores
Colesterol Total (CT)	239 mg.dL ⁻¹ ± 1 mg.dL ⁻¹
Lipoproteína de Alta densidade (HDL)	82 mg.dL ⁻¹ ± 1 mg.dL ⁻¹
Triglicerídeos (TG)	126 mg.dL ⁻¹ ± 1 mg.dL ⁻¹
Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)	131 mg.dL ⁻¹ ± 1 mg.dL ⁻¹
Glicose	78 mg.dL ⁻¹ ± 1 mg.dL ⁻¹

A partir da Tabela 9 observa-se que o voluntário utilizado para essas medidas apresenta o valor de colesterol total acima do valor recomendado (a Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda valores de colesterol total abaixo de 200 mg/dL) e o valor encontrado para a LDL também está acima do normal (LDL < 130 mg/dL), já os outros valores encontram-se dentro do normal.

5.3.1 Biossensor Európio-Clorotetraciclina

Primeiro estudou-se a absorção do complexo EuCTc na presença de um íon interferente Magnésio [13] com o plasma. Nessa parte do estudo optou-se por utilizar o interferente Magnésio, pois esse está em maior concentração no plasma. Utilizou-se 500 µL de EuCTc, 500 µL de íon interferente e variou-se a quantidade de plasma humano, o volume final foi completado com MOPS. As soluções foram mantidas em repouso por 15 minutos antes da obtenção do espectro de absorção e emissão. Para as medidas de absorção utilizou-se uma cubeta com caminho óptico de 1mm, para as análises do EuCTcMg na presença do plasma e na presença da LDL.

Na Figura 42 é possível observar o espectro de absorção do complexo EuCTcMg na presença de diferentes quantidades de plasma humano. A absorção do complexo na presença do plasma humano não sofre um deslocamento na banda de absorção da clorotetraciclina. Com o aumento da quantidade de plasma é observado um aumento na banda de absorção da clorotetraciclina em 277 nm. A banda atribuída ao complexo EuCTc no entanto não sofre alterações significativas na presença de plasma.

Figura 42 - Espectro de absorção do complexo EuCTcMg na presença do Plasma Humano.

A partir do espectro de absorção do complexo na presença do plasma, fez-se o espectro de emissão do mesmo, excitando o complexo em 400 nm. O espectro de emissão pode ser visto na Figura 43.

Figura 43- Espectro de emissão do complexo EuCTcMg na presença do plasma humano.

Na Figura 43 mostra-se o espectro de emissão do complexo EuCTcMg na presença de diferentes quantidades de plasma humano. Observa-se que com 10 µL de plasma ocorre um aumento na banda de emissão do íon Európio, entretanto com o aumento na quantidade de plasma não se observa um aumento na banda de emissão do íon, mas sim uma saturação na emissão, e para a maior quantidade de plasma 100 µL se observa uma diminuição na emissão do íon Európio. Também na Figura 43 nota-se uma banda de emissão em torno de

515 nm, correspondente à transição do estado tripleto da molécula da clorotetraciclina para o estado fundamental. O aparecimento dessa banda indica que os componentes do plasma se ligam a clorotetraciclina formando um complexo mais efetivo que o íon Európio, aumentando assim a probabilidade de emissão do íon ligante.

Para estudar melhor o aumento da emissão da Clorotetraciclina com o aumento na quantidade de plasma, traçou-se a curva de calibração mostrada na Figura 44. Para cada valor de área foi estimado um erro de 5%.

Figura 44 - Curva de calibração da emissão da Clorotetraciclina no complexo EuCTcMg na presença do plasma humano.

Na Figura 44 observa-se que o aumento da área de emissão da Clorotetraciclina obedece a uma relação linear com o aumento da quantidade de plasma humano, sendo possível escrever uma equação linear do tipo $y = a + bx$ com $a = (5,87 \pm 0,14) \cdot 10^6$ e $b = (4,46 \pm 0,22) \cdot 10^6$. O ajuste apresentou um valor de R-Quadrado de 0,97. Para o plasma foi encontrado o limite de detecção de LD= 0,14 μL e limite de quantificação de LQ= 0,44 μL.

Para verificar a influência do íon interferente na emissão do complexo EuCTc na presença do plasma, fez-se o espectro de absorção e emissão do complexo sem o íon interferente na presença do plasma humano. A Figura 45 mostra o espectro de absorção do complexo EuCTc sozinho e na presença do plasma, novamente não é observado um deslocamento na banda de absorção da clorotetraciclina e um aumento na emissão da banda em 277 nm.

Figura 45 - Espectro de absorção do complexo EuCTc na presença do plasma humano.

A partir do espectro de absorção do complexo na presença do plasma, fez-se o espectro de emissão do complexo, excitando com 400 nm.

Na Figura 46 observa-se a emissão do complexo EuCTc na presença de diferentes quantidades de plasma humano. Analisando a emissão do íon Európio no complexo EuCTc observa-se um aumento na emissão do mesmo com a adição de 20 µL de plasma, entretanto aumentando essa quantidade de plasma não ocorre um aumento na emissão do íon, e nota-se um aumento na emissão da banda em 511 nm, resultado igual ao encontrado na Figura 43. Portanto pode-se dizer que a presença do íon interferente não modifica a mudança na emissão do complexo EuCTc na presença do plasma com relação ao aumento na banda de emissão em 511 nm referente a clorotetraciclina.

Figura 46 - Espectro de emissão do complexo EuCTc na presença do plasma humano.

Para estudar melhor a emissão da Clorotetraciclina, preparou-se uma solução de CTc na mesma molaridade utilizada no complexo EuCTc, e adicionou-se diferentes quantidades de plasma e obteve-se os espectros de absorção e emissão do íon ligante sozinho e na presença do plasma.

Na Figura 47 é possível observar o espectro de absorção da Clorotetraciclina sozinha, na presença do plasma humano e na presença do íon interferente mais o plasma humano. Com a adição de plasma na clorotetraciclina não se observa um deslocamento na banda de absorção com máximo em 373 nm, mas com a presença do íon Magnésio a banda apresenta um leve deslocamento para o vermelho com $\lambda = 377$ nm.

Figura 47 - Espectro de absorção da clorotetraciclina na presença do plasma humano, com e sem o íon interferente.

De acordo com os resultados encontrados, obteve-se o espectro de emissão da clorotetraciclina sozinha na presença do plasma para verificar se também aconteceria um aumento na banda de emissão sem a complexação com o íon Európio. Para esse estudo optou-se por excitar a clorotetraciclina no mesmo comprimento de onda utilizado para excitar o complexo EuCTc $\lambda = 400$ nm.

Figura 48 - Espectro de emissão da CTc na presença do plasma.

Na Figura 48 é possível observar que a clorotetraciclina apresenta uma emissão dez vezes maior na presença do plasma e aumentando a quantidade de plasma, aumenta a emissão da CTc. Quando se compara a emissão da CTc com e sem o íon interferente na

presença do plasma, nota-se um aumento na banda de emissão quando o mesmo está com o íon interferente e um deslocamento para o vermelho, como o íon Mg apresenta uma carga positiva ele exerce uma maior atração nos componentes do plasma que estão com uma carga negativa que poderia ser a LDL, levando ao aumento maior na banda de emissão da clorotetraciclina. Na Figura 48 também pode se observar que o plasma quando excitado sozinho em 400 nm não apresenta uma banda de emissão nessa região, mostrando que o aumento na emissão da CTc é devido à complexação da molécula com algum constituinte do plasma humano.

Para confrontar os resultados obtidos com o plasma, fez-se o mesmo estudo com a LDL ultracentrifugada desse plasma. Primeiro se obteve o espectro de absorção do complexo EuCTcMg na presença de diferentes concentrações de LDL, conforme mostrado na Figura 49.

Figura 49 - Espectro de absorção do complexo EuCTcMg na presença da LDL.

Na Figura 49 observa-se o espectro de absorção do complexo EuCTcMg na presença da LDL, conforme visto no espectro de absorção do complexo na presença do plasma, não há um deslocamento da banda de absorção da clorotetraciclina na presença da LDL. As bandas no ultravioleta sofreram um aumento com o aumento da concentração de LDL.

Fez-se o espectro de emissão do complexo EuCTcMg na presença da LDL, excitando o complexo com o comprimento de onda de 400 nm, mesmo comprimento de onda utilizado para excitar o complexo na presença do plasma. Na Figura 50 observa-se o

espectro de emissão do complexo EuCTcMg na presença de diferentes concentrações de LDL.

Na Figura 50 nota-se que a emissão do íon Európio apresenta um aumento linear com o aumento na concentração de LDL. Para uma concentração alta de LDL ($3,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) é possível observar um pequeno aumento na banda de emissão da clorotetraciclina. Para ter um melhor estudo do aumento da emissão do complexo na presença da LDL, traçou-se a curva de calibração a partir da área integrada do pico de emissão do íon Európio conforme Figura 51. Neste caso é possível se verificar que a emissão do európio foi mais representativa que a emissão da clorotetraciclina, diferentemente do que ocorreu na presença do plasma.

Figura 50 - Espectro de emissão do complexo EuCTcMg na presença de diferentes concentrações de LDL.

Figura 51- Curva de calibração do complexo EuCTcMg na presença da LDL.

A curva de calibração foi obtida a partir da área integrada apenas do pico de emissão do íon Európio, para não ter a influência do pico de emissão da Clorotetraciclina que apareceu para altas concentrações de LDL Nativa . A Figura 51 pode ser ajustada por uma equação linear $y = a + bx$ com $a = (3,14 \pm 0,27) \cdot 10^6$ e $b = (1,04 \pm 0,66) \cdot 10^6$. Nesse caso observou-se uma saturação no sinal de emissão do complexo EuCTcMg para concentrações acima de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Essa saturação não foi obtida quando traçou-se a curva de calibração do complexo EuCTc na presença da LDL nativa (Figura 25), a saturação no sinal dessa vez pode ter ocorrido pois a emissão da clorotetraciclina passou a acontecer devido a presença do íon interferente, resultado semelhante ao encontrado para o plasma sanguíneo. O limite de detecção para o biossensor foi igual à $0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o limite de quantificação foi igual à $0,63 \text{ mg.mL}^{-1}$.

5.3.2 Biossensor – Tioflavina T (ThT)

Como visto nesse trabalho, a Tioflavina T pode ser utilizada para marcar a LDL e também diferencia-se entre a LDL nativa e a LDL oxidada. Portanto estudou se esse biossensor poderia ser utilizado para quantificar a LDL diretamente no plasma humano.

Primeiro obteve-se o espectro de absorção da ThT sozinha e na presença do plasma humano, para manter o mesmo volume final nas amostras foi completado com água bideionizada. Nota-se na Figura 52 que a banda de absorção da ThT não apresenta nenhum deslocamento e aparece uma pequena banda de absorção em torno de 480 nm.

Figura 52 - Espectro de absorção da Tioflavina T na presença do plasma humano.

Em seguida, obteve-se o espectro de emissão da ThT na presença de diferentes quantidades de plasma, nesse caso novamente utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 450 nm, como utilizado anteriormente nesse trabalho.

Figura 53 - Espectro de emissão da ThT na presença de diferentes quantidades de plasma.

Figura 54 - Curva de calibração ThT na presença do plasma humano.

Com o aumento na quantidade de plasma se observa um aumento na emissão da ThT como visto na Figura 53. A partir do espectro de emissão obteve-se a curva de calibração, conforme mostrado na Figura 54 e foi estimado um erro de 5% para cada ponto. A curva de calibração mostra que o aumento na área de emissão da ThT com relação ao aumento na quantidade de plasma apresenta uma relação linear que pode ser descrita como uma equação do tipo $y = a + bx$ com $a = (2,05 \pm 0,7.10^7)$ e $b = (3,31 \pm 0,22).10^6$. A partir da Figura 53 é possível observar um indício de saturação do sinal de emissão do corante a partir de 50 µL de plasma. Isso mostra que para pequenas quantidades de plasma obtém-se um aumento da emissão do corante, sendo essa uma boa característica quando se pretende utilizar a emissão do corante para uma possível quantificação de LDL diretamente no plasma.

Para tentar relacionar a emissão do corante ThT na presença do plasma, fez-se o mesmo estudo com a LDL ultracentrifugada.

A Figura 55 mostra o espectro de absorção da ThT na presença de diferentes concentrações de LDL. Observa-se que a ThT quando complexada com a LDL não apresenta um deslocamento na banda de absorção, resultado igual ao encontrado para a ThT na presença do plasma.

Figura 55 - Espectro de absorção da ThT na presença da LDL.

Fez-se o espectro de emissão da ThT na presença de diferentes concentrações de LDL.

Figura 56 - Espectro de emissão da ThT na presença da LDL.

Na Figura 56 é possível observar que a emissão da ThT apresenta um aumento com o aumento da concentração de LDL. A partir da Figura 56 obteve-se a curva de calibração a partir da área integrada da banda de emissão da ThT em 480 nm. Para a curva de calibração foi estimado um erro de 5% para cada ponto. O aumento na área do espectro de emissão da ThT na presença da LDL obedece uma equação linear do tipo $y = a + bx$ com

$a = (6,5 \cdot 10^6 \pm 0,6) \cdot 10^6$ e $b = (1,00 \pm 0,04) \cdot 10^7$ como mostrado na Figura 57. O limite de detecção foi de $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o limite de quantificação de $0,40 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Figura 57 - Curva de calibração da ThT na presença da LDL.

No estudo na emissão dos biossensores direto no plasma humano serão necessários mais experimentos com relação à interferência de outros componentes presentes no plasma sanguíneo. Esses testes serão necessários para analisar a interferência na emissão tanto da clorotetraciclina, quanto do corante ThT para verificar se o aumento da emissão é devido apenas a presença das partículas de LDL. Na continuação desse trabalho serão refeitos esses experimentos utilizando o plasma de coelhos, que serão submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica com isso resultados mais conclusivos a respeito dos biossensores diretamente no plasma.

5.4 Irradiação da LDL com laser de pulsos ultracurtos.

Na última etapa desse trabalho, estudou-se a irradiação com laser de pulsos ultracurtos para promover uma modificação oxidativa nas partículas de LDL. A LDL em seu estado oxidado é mais aterogênica que a mesma em seu estado nativo [3].

5.4.1 Estudo do tempo de irradiação com laser

Na primeira parte do estudo, uma quantidade de 5 mL de LDL nativa (1 mg.mL^{-1}) foi dividida em 5 tubos de eppendorf. Uma das amostras não foi irradiada e as outras foram irradiadas em tempos de 2 min, 4 min, 8 min e 16 min, conforme a Figura 58. Após o procedimento as amostras foram envolvidas em papel alumínio e mantidas sob refrigeração. As amostras foram irradiadas com um laser de comprimento de onda centrado em 785 nm, com duração temporal do pulso de 25 fs, com taxa de repetição de 4 kHz e energia de 750 μJ . O feixe apresentava um diâmetro de cerca de 4 mm, com isso toda a solução de LDL foi irradiada.

Figura 58 - Soluções de LDL após irradiação

Como é possível observar na Figura 58 a solução de LDL Nativa, não irradiada, apresenta uma coloração amarelada, essa cor é devido à presença de antioxidantes principalmente o betacaroteno e o alfatocoferol. O betacaroteno absorve em torno de 400-550 nm [115]. Os espectros de absorção das soluções de LDL irradiadas pelos diferentes tempos é apresentado na Figura 59.

Figura 59 - Absorção das soluções de LDL irradiadas com diferentes tempos.

Na Figura 59 nota-se a diminuição na banda de absorção dos 400 – 550 nm, indicando que a irradiação com laser de pulsos ultracurtos promove uma remoção do betacaroteno da partícula deixando-a mais susceptível a oxidação. No experimento foi possível observar um aumento na linha base do espectro de absorção para LDL irradiada, isso ocorre por causa do espalhamento Rayleigh que é devido à agregação da proteína, esse espalhamento foi subtraído para melhor visualização da banda de absorção.

5.4.2 Estudo da temperatura das soluções de LDL irradiadas com laser

Sabe-se que a LDL em solução não pode sofrer um grande aquecimento devido à possibilidade de degradação da partícula, portanto estudou-se o aquecimento gerado pela irradiação com o laser de pulsos ultracurtos. A temperatura da solução foi obtida através de um termopar inserido na solução antes da irradiação e imediatamente após a irradiação, os resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10- Valores de temperatura das soluções antes e após a irradiação com laser

Tempo de irradiação (min)	Temperatura Inicial (°C)	Temperatura Final (°C)	ΔT (°C)
2	18,5	21,5	3,0
4	19,7	22,8	3,1
8	17,6	23,6	6,0
16	20,5	27,2	6,7

A Tabela 10 mostra que a máxima temperatura alcançada pela solução de LDL foi à solução irradiada por 16 min, entretanto o valor ficou bem abaixo da temperatura corpórea. Como o ponto de fusão do betacaroteno é de 180 °C, o aumento da temperatura da solução não foi responsável pela perda da coloração da amostra.

5.4.3 Estudo da variação de energia do laser

Em seguida estudou-se a variação de energia de irradiação para verificar se a utilização de uma energia menor também alteraria as propriedades ópticas da partícula de LDL. Para isso fixou-se o tempo de irradiação em 15 min, e variou-se a energia de irradiação de 200 – 750 μJ .

Figura 60 - Absorção das soluções de LDL irradiadas com diferentes energias.

Na Figura 60 nota-se que a solução de LDL quando irradiada com energia de 200 μJ não promove uma modificação na banda de absorção da partícula da LDL. A partir da energia 300 μJ de irradiação observa-se uma diminuição na banda de absorção, promovendo o início de modificação na partícula de LDL.

A partir da Figura 60 foi feita a área integrada da banda de absorção entre 400-550 nm para estudar a diminuição na concentração do antioxidante betacaroteno, o resultado pode ser visto na Figura 61.

Figura 61 - Área integrada da absorção do beta-caroteno para diferentes energias de irradiação. A curva foi ajustada pela função de Boltzmann: $y = A2 + (A1-A2)/[1.\exp((x-x0)/p)]$, $A1 = 2621,34 \pm 53,73$, $A2 = 1916,69 \pm 60,87$, $x0 = 388,13 \pm 26,82$ e $p = 74,56 \pm 23,70$.

Na Figura 61 é possível observar a diminuição na área da banda de absorção do betacaroteno, indicando que ocorre um consumo desse antioxidante durante a irradiação com diferentes energias. Na Figura 61 observa-se que para a energia de 200 µJ não ocorre nenhuma modificação no betacaroteno, apenas para energias acima desse valor. A fluência média é a energia do feixe dividida pela área. Para o betacaroteno a fluência mínima para iniciar uma modificação foi de $1,6 \text{ mJ.cm}^{-2}$.

O antioxidante mais abundante na partícula de LDL é o alfatocoferol. Para quantificar a diminuição na concentração desse antioxidante fez a quantificação de alfatocoferol por técnica de HPLC.

Figura 62 - Concentração de alfatocoferol presente nas partículas de LDL irradiadas com diferentes energias. A curva foi ajustada pela função de Boltzmann. $y = A2 + (A1-A2)/[1.\exp((x-x0)/p)]$, com $A1 = 119,85 \pm 0.61$, $A2 = 101,24 \pm 0.51$, $x0 = 351,86 \pm 8.04$ e $p = 34,85 \pm 5,12$.

Na Figura 62 nota-se que a concentração de alfatocoferol diminui com o aumento da energia de irradiação, essa diminuição pode ser descrita por uma função sigmoideal e novamente vemos que para energia de 200 µJ não há modificação na concentração do antioxidante, resultado semelhante ao encontrado para o betacaroteno. A fluência média mínima para iniciar a modificação do alfatocoferol foi de $1,6 \text{ mJ.cm}^{-2}$.

Embora pulsos ultracurtos gerem altas densidades de potência o comprimento de onda utilizado (785 nm ou 1,58 eV) não é suficiente para excitar o betacaroteno e o alfatocoferol, provavelmente a modificação seja devido a uma absorção de multifótons, sendo absorção de 2 fótons para o betacaroteno ($E_{ex} \sim 3,16 \text{ eV}$) e uma absorção de 3 fótons para o alfatocoferol ($E_{ex} \sim 4,74 \text{ eV}$). Os antioxidantes são responsáveis pela captura dos radicais livres, evitando assim a destruição dos lipídios, a irradiação de 15 min com pulsos ultracurtos degradam essas moléculas de antioxidantes permitindo a oxidação da LDL através dos radicais livres existentes.

5.4.4 Caracterização química das soluções de LDL irradiadas com laser

Para entender melhor a modificação provocada pela irradiação com pulsos ultracurtos compararam-se as soluções irradiadas com a metodologia mais utilizada para oxidar as partículas de LDL que é a oxidação através de íons metálicos (Cobre e Ferro). Todas as soluções de LDL apresentam a mesma concentração $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Para esse estudo de comparação analisou-se a absorção dos antioxidantes no intervalo de 400 – 550 nm, a peroxidação lipídica, a modificação provocada na apoB-100 através de cromatografia de exclusão molecular, a formação de cargas negativas na superfície da partícula através de eletroforese, a emissão do corante ThT na presença das diferentes soluções e por fim o tempo de vida e anisotropia do triptofano presente na apoB-100.

No estudo da absorção das soluções de LDL utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm e obteve-se a Figura 63.

Figura 63 - Absorção das soluções de LDL.

Na Figura 63 nota-se que a LDL oxidada por íons de Ferro apresenta ainda antioxidantes nas partículas, entretanto já aparece em menor quantidade do que a LDL Nativa. A LDL irradiada com energia de 350 μJ também apresenta uma quantidade de antioxidantes semelhante à oxidada com íons de Ferro. Já a LDL oxidada por íons de cobre e irradiada com energia de 712 μJ não apresentam absorção dos 400 – 550 nm indicando um consumo completo desses antioxidantes.

Para comprovar que a modificação na partícula de LDL com a irradiação de LDL gera uma peroxidação lipídica foram feitos experimentos para detectar as diferentes etapas do processo de peroxidação. Para isso foram refeitas as irradiações, agora em triplicata, das partículas de LDL fixando o tempo de irradiação em 15 minutos e variando as energias de 300 a 750 μJ. As amostras de LDL eram de um “pool” de 3 amostras diferentes de LDL, o pool foi separado em três amostras e foram feitas as irradiações.

A primeira etapa de oxidação da partícula de LDL ocorre quando um ácido graxo poliinsaturado é atacado por uma espécie reativa para retirar um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno, após um rearranjo molecular. Forma-se então o dieno conjugado (duas ligações duplas entre uma ligação simples) [40]. A detecção desses dienos conjugados mostra o início da peroxidação lipídica da partícula de LDL. Os dienos conjugados apresentam absorção máxima em 234 nm. A Figura 64 mostra a detecção dos dienos conjugados.

Figura 64 - Detecção de dienos conjugados para as amostras de LDL irradiadas com laser e oxidadas com íons metálicos.

Na Figura 64 é possível observar a formação de dienos conjugados nas amostras de LDL irradiadas e oxidadas com íons metálicos. Comparando-se as amostras irradiadas com as amostras oxidadas por íons metálicos, nota-se que a formação dos dienos conjugados é menor nas irradiadas do que nas oxidadas por Cobre e Ferro, o que mostra que a modificação promovida com a irradiação para a primeira etapa de peroxidação lipídica é mais branda que para a oxidação com íons metálicos. Comparando-se os valores obtidos para as diferentes energias de irradiação é possível observar que um aumento na energia de irradiação promove um aumento na detecção de dienos conjugados.

A segunda etapa da peroxidação lipídica é a formação dos hidroperóxidos lipídicos. Essa etapa ocorre da reação do radical peroxila com um átomo de hidrogênio, ou quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação da mesma cadeia do ácido graxo [40]. O aumento na absorbância a 234 nm é devido a um aumento na quantidade de dienos conjugados nas amostras, e o aumento de dienos conjugados está relacionado com o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), portanto através da equação $\Delta[LOOH] = 2,05 \frac{\Delta A_{234}}{\epsilon_{cd}}$, é possível obter a concentração dos hidroperóxidos lipídicos nas amostras de LDL, onde $\Delta[LOOH]$ é a mudança na concentração de hidroperóxidos lipídicos; ΔA_{234} é a variação na absorbância em 234 nm relacionada a LDL Nativa e ϵ_{cd} é um coeficiente de extinção para dienos conjugados [111].

Figura 65 - Concentração de hidroperóxidos lipídicos.

Na Figura 65 observa-se que as amostras de LDL irradiadas com pulsos ultracurtos apresentam a formação de hidroperóxidos lipídicos. Como a obtenção da quantificação de hidroperóxidos lipídicos foi feita a partir do cálculo da variação da absorção em 234 nm sendo a LDL Nativa utilizada como amostra padrão, a Figura 66 apresenta apenas os valores obtidos para as amostras irradiadas e oxidadas por íons metálicos. Comparando-se as amostras irradiadas observa-se um aumento na concentração dos hidroperóxidos lipídicos com o aumento da energia de irradiação. Comparando-se os valores obtidos das amostras irradiadas com as amostras oxidadas por íons metálicos, observa-se novamente uma menor formação de hidroperóxidos nas amostras irradiadas.

O teste TBARS é uma das técnicas mais utilizadas para mostrar a oxidação de lipídeos [40]. O teste TBARS foi introduzido por Kohn e Liversedge [116]. O teste consiste na detecção de um cromóforo róseo formado pela ligação do malonaldeído (MDA) com duas moléculas de ácido Tiobarbiturico, em meio ácido, em alta temperatura. O teste do TBARS foi realizado nas amostras de LDL irradiadas como mostrado na Figura 66.

Figura 66 - Teste TBARS para as amostras de LDL irradiadas.

Na Figura 66 é possível observar que as amostras de LDL irradiadas com diferentes energias apresentam a formação do MDA e que o aumento na energia gera um aumento na formação do MDA. Comparando-se as a fs-LDL (750 μ J) com a FeLDL observa-se valores muito próximos para a formação de MDA nas soluções de LDL e quando comparadas as soluções irradiadas com a CuLDL, observa-se que a soluções irradiadas

formaram menos MDA, indicando um nível de oxidação mais brando nas partículas de LDL.

A partir das Figura 64, Figura 65, Figura 66, comprovou-se que a irradiação com laser de pulsos ultracurtos promove uma peroxidação lipídica nas partículas de LDL, que é diretamente dependente da energia do laser utilizada, quanto maior a energia do laser maior a formação dos compostos. Comparando-se os resultados obtidos com as soluções de LDL irradiadas com as soluções de LDL oxidadas por íons metálicos nota-se que a oxidação promovida com a irradiação é mais branda que a provocada por íons metálicos.

Para continuar o estudo da modificação sofrida pela partícula de LDL quando irradiada fez-se um estudo a respeito de uma possível modificação na proteína apoB-100 devido a irradiação. A cromatografia de exclusão molecular separa as partículas de LDL pelo peso molecular e como o comprimento de onda selecionado nessa análise foi 280 nm analisa-se a parte proteica da lipoproteína de baixa densidade.

Primeiro comparou-se o cromatograma das soluções de LDL irradiadas com diferentes energias (300 μ J, 500 μ J e 750 μ J) com a LDL Nativa. Na Figura 67 é possível observar que o cromatograma de exclusão molecular apresenta um pico maior com mesma altura para todas as amostras, esse pico em torno de 15 min é referente às partículas de LDL que não sofreram modificações na proteína. Das soluções irradiadas apenas a irradiada com maior energia 750 μ J apresentou um segundo pico em torno de 35 minutos referente às partículas de LDL que sofreram alguma modificação proteica.

Figura 67 - Cromatograma de exclusão molecular das amostras de LDL irradiadas com três energias (300, 500 e 750 μJ) e LDL nativa.

Após comparar-se as amostras irradiadas entre si e com a LDL Nativa, estudou-se o cromatograma das amostras oxidadas por íons metálicos com a amostra irradiada que apresentou uma modificação na proteína, ou seja, a fs-LDL (750 μJ).

Na Figura 68 é possível observar o cromatograma da LDL Nativa, a CuLDL, a Fe-LDL e a fs-LDL (750 μJ). Na Figura 68 observam-se dois picos, um pico com 15 minutos igual em todas as amostras referente às partículas de LDL com maior peso molecular que não sofreram modificações na proteína e um pico em torno de 30 min, referente às partículas de LDL que sofreram modificações proteicas. A amostra CuLDL foi a que apresentou o segundo pico com maior intensidade, mostrando uma maior modificação na proteína, a Fe-LDL mostrou uma modificação menor, esses resultados estão de acordo com os previstos na literatura [117] e a fs-LDL (750 μJ) também apresentou uma modificação na proteína, mas em um tempo de retenção menor que as outras amostras, mostrando uma modificação mais branda que as amostras oxidadas por íons metálicos.

Figura 68 - Cromatografia de exclusão molecular das amostras irradiadas e oxidadas com íons metálicos.

Em seguida, analisou-se se a irradiação promovia um acúmulo de cargas eletronegativas na superfície da partícula, para isso fez-se a eletroforese das amostras irradiadas e novamente comparou-se com as amostras oxidadas por íons metálicos. A eletroforese é uma técnica muito utilizada para detectar a mobilidade eletroforética de lipoproteínas e também pode ser utilizada para separar as diferentes partículas através de sua carga [118], [119]. A eletroforese foi feita em gel de agarose 0,5% com 45 μ g de proteína em cada poço. A correspondência entre os números e as amostras apresentadas na Figura 69 pode ser observada na Tabela 11.

Figura 69 - Eletroforese LDL.

Tabela 11 - Numeração utilizada na eletroforese.

Solução de LDL	Tipo de amostra
1	LDL Nativa
2	fs-LDL (300 μ J)
3	fs-LDL (500 μ J)
4	fs-LDL (750 μ J)
5	CuLDL
6	FeLDL

Na Figura 69 mostra-se o gel da corrida das amostras de LDL. É possível observar que as amostras irradiadas apresentam a formação de uma carga eletronegativa em sua superfície, pois quando comparada com a LDL Nativa nota-se que as amostras de LDL irradiadas descem mais no gel que a Nativa. As amostras irradiadas com 300 e 500 μ J apresentaram um acúmulo de cargas negativas parecidos. Já a fs-LDL (750 μ J) foi a que desceu mais no gel, sofrendo um maior acúmulo de cargas negativas na superfície. Com relação às amostras irradiadas com íons metálicos nota-se que a fs-LDL (750 μ J) apresenta uma mobilidade eletroforética semelhante a FeLDL. A amostra de Cu-LDL foi a amostra que apresentou a maior mobilidade eletroforética.

A partir dos resultados obtidos pode-se dizer que a irradiação das soluções de LDL promove uma modificação caracterizada como oxidação, promovendo uma peroxidação lipídica e uma modificação na apoB-100, e quando comparada com as metodologias mais utilizadas em análises *in vitro*, obteve-se uma modificação mais branda da partícula de LDL.

5.4.5 Emissão do corante ThT na presença da LDL Nativa, Cu-LDL, Fe-LDL e fs-LDL

Stewart e colaboradores [16] publicaram que o corante ThT na presença da LDL oxidada apresenta um aumento na emissão do corante. Portanto, nesse estudo observou-se o comportamento do corante ThT na presença da LDL Nativa, CuLDL, FeLDL e fsLDL, conforme mostrado na Figura 70.

Figura 70 - Emissão do corante ThT na presença da LDL Nativa, CuLDL, FeLDL e fsLDL

A Figura 70 mostra que a emissão do corante na presença da CuLDL é aproximadamente o dobro da emissão do corante na presença da LDL Nativa. Já para a FeLDL e para a fs-LDL (350 μ J) essa diferença é muito menor, o que pode indicar uma menor formação das fibrilas semelhantes as fibrilas de amiloidose. Para a fsLDL (712 μ J) a ThT apresentou uma maior emissão quando comparada com a FeLDL e fsLDL (350 μ J).

5.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão das partículas de LDL

Para ilustrar a oxidação sofrida pelas partículas de LDL irradiadas e nativa obteve-se as imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Para as medidas de microscopia eletrônica as soluções de LDL foram diluídas para concentrações de 0,5 mg.mL⁻¹.

Figura 71-Microscopia eletrônica para as partículas de LDL nativa.

Figura 72- Microscopia eletrônica das partículas de LDL irradiada com 500 μ J.

Figura 73- Microscopia eletrônica para as partículas de LDL irradiadas com 712 μ J.

Figura 74 - Microscopia eletrônica para as partículas de CuLDL.

Figura 75 - Microscopia Eletrônica das partículas de FeLDL.

Na Figura 71 observa-se a imagem da microscopia eletrônica para as partículas de LDL Nativa. É possível observar que as partículas de LDL Nativa são redondas e não apresentam a formação de aglomerados. Já para as LDL irradiadas apresentam a formação de aglomerados (Figura 72 e Figura 73). As Figura 74 e Figura 75 mostram as imagens de microscopia para as soluções de LDL oxidadas por íons metálicos. As partículas oxidadas por íons metálicos também apresentam a formação de aglomerados. Esse resultado está de acordo com o encontrado para as LDL oxidadas por íons metálicos na literatura [117], [114].

5.4.7 Estudos da fluorescência do triptofano nas amostras de LDL modificadas

Figura 76 - Emissão do triptofano presente na partícula de LDL.

Um dos aminoácidos essenciais que compõe a proteína apoB-100 existente na partícula de LDL é o triptofano. A apoB-100 apresenta 37 resíduos de triptofano, desses trinta e sete resíduos, de oito a nove resíduos estão localizados na superfície da apoB-100 e o restante está localizado na parte interna da proteína. Para comparar os diferentes tipos de oxidação da partícula de LDL e continuar o estudo da modificação na proteína apoB-100 foi feito a emissão do triptofano para a LDL Nativa, FeLDL, CuLDL, fs-LDL (350 μJ) e fs-LDL (750 μJ).

A Figura 76 mostra a emissão do triptofano para os diferentes tipos de oxidação da partícula de LDL. A emissão fluorescente do triptofano foi feita com excitação com comprimento de onda de 280 nm. Para a LDL Nativa a emissão do triptofano apresenta um máximo de 340 nm, e ocorre um deslocamento para o azul na LDL oxidada por íons de ferro com máximo de 339 nm. As soluções de LDL irradiadas com laser apresentaram um máximo de 340,5 nm para fs-LDL (350 μJ) e um máximo de 341 nm para fs-LDL (750 μJ). Já a LDL oxidada por íons de Cobre apresentou um deslocamento para o vermelho com máximo de 360 nm. Sabe-se que o triptofano livre apresenta um máximo de emissão em 353 nm, esse deslocamento da emissão do triptofano na partícula de LDL mostra que esse se encontra em um ambiente hidrofóbico [29], indicando também uma desordem na estrutura lipídica, sugerindo a formação de estruturas semelhantes a micelas. Quando a LDL é irradiada com laser ocorre um pequeno deslocamento na banda de emissão para o

vermelho o que sugere uma perda tanto de resíduos de triptofano como de fluorescência do triptofano. Quando a LDL é oxidada com íons de cobre sabe-se que os íons associam-se aos resíduos de triptofano presentes na superfície da proteína promovendo uma diminuição na emissão do mesmo por expor esses resíduos a um ambiente hidrofóbico. Irradiação da LDL com o laser e oxidação da LDL com Ferro causa a exposição dos resíduos de triptofano para um ambiente aquoso e uma menor oxidação direta desse resíduo.

Para continuar o estudo da degradação da proteína presente na partícula de LDL, mediu-se o tempo de vida de emissão do triptofano nas soluções de LDL (Figura 77). Para o estudo do tempo de vida do triptofano utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 296 nm e a emissão em 350 nm.

Figura 77 - Tempo de vida triptofano nas partículas de LDL, para excitação em 296 nm e emissão em 350 nm.

Na Tabela 12 estão os valores dos tempos de decaimento e fatores pré-exponenciais utilizados para calcular os tempos de vida médio de decaimento do triptofano presente nas partículas de LDL. A emissão do triptofano na molécula de LDL pode ser descrito por uma exponencial tripla.

$$y = y_0 + B_1 e^{\frac{t}{\tau_1}} + B_2 e^{\frac{t}{\tau_2}} + B_3 e^{\frac{t}{\tau_3}} \quad \text{Equação 4}$$

$$\tau_m = \frac{\sum_i B_i \tau_i^2}{\sum_i B_i \tau_i} \quad \text{Equação 5}$$

A partir dos tempos de decaimento e fatores pré-exponenciais da Equação 4 calculou-se o tempo de vida médio a partir da Equação 5.

A Tabela 12 mostra os valores para tempos de decaimento, fatores pré-exponenciais e tempo de vida médio para as diferentes amostras de LDL. Nas soluções de LDL Nativa, FeLDL (350 μ J) e fs-LDL (750 μ J), nota-se que há um longo tempo de decaimento em torno de 5 ns, um tempo de decaimento intermediário em torno de 1,5 ns e um tempo de decaimento curto entre 0,2 a 0,4 ns. Já para CuLDL o tempo de vida de decaimento do triptofano é menor que nas outras soluções de LDL, o tempo de vida longo é de 3,99 ns, um tempo de vida intermediário de 0,99 ns e um tempo de vida curto de 0,12 ns.

A diferença encontrada no tempo de vida médio da LDL oxidada com cobre para a LDL nativa indica que a oxidação por íons de cobre afeta a proteína apoB-100. A mudança no tempo de vida e nos fatores pré-exponenciais mostram que o ambiente em torno dos resíduos de triptofano é modificado. Já a irradiação com laser e oxidação por íons de ferro apresentam um efeito intermediário nos resíduos de triptofano da proteína, com uma pequena diminuição no tempo de vida sem grande modificação nos fatores pré-exponenciais, o que indica a preservação das propriedades estruturais em volta do triptofano.

Tabela 12- Cálculo do tempo de vida médio de decaimento do Triptofano na LDL.

	τ_1	τ_2	τ_3	B_1	B_2	B_3	$\langle\tau\rangle$	χ^2
LDL Nativa	5,8	1,5	0,46	0,058	0,106	0,069	4,12	1,18
FeLDL	5,62	1,80	0,40	0,060	0,110	0,068	4,02	1,24
fsLDL (350 μJ)	5,29	1,63	0,33	0,068	0,108	0,061	3,95	1,19
fsLDL (712 μJ)	5,09	1,44	0,24	0,074	0,113	0,056	3,90	1,11
CuLDL	3,99	0,99	0,12	0,031	0,105	0,174	2,36	1,44

Por fim, estudou-se a anisotropia do triptofano nas partículas de LDL irradiadas com diferentes energias e oxidadas por íons metálicos. A Figura 78 mostra os decaimentos da anisotropia para as soluções de LDL irradiadas com 350 e 712 μ J, a FeLDL e CuLDL e os compara com o triptofano em meio aquoso. A Tabela 13 mostra os valores obtidos da anisotropia para a LDL Nativa, CuLDL, FeLDL e fs-LDL (350 e 712 μ J). A anisotropia do triptofano isolado em meio aquoso decai rapidamente e pode ser ajustado para um decaimento mono-exponencial com tempos de correlação rotacional tipicamente de 80 ps a anisotropia para tempos longos é zero. Já para o triptofano na partícula de LDL são necessários dois tempos de correlação rotacional para ajustar os dados. O tempo de correlação rotacional curto é devido ao movimento do triptofano local e o tempo de correlação longo é devido à queda global da região da macromolécula contendo os resíduos fluorescentes [120].

Figura 78 - Decaimento da anisotropia para as amostras irradiadas com 350 e 712 μJ e as amostras oxidadas com Cobre e Ferro, e do triptofano em solução aquosa.

A oxidação de LDL por íons de Ferro ou pulsos de laser não afeta os processos que conduzem à degradação da intensidade de fluorescência do Triptofano, mas a cinética de rotação do resíduo é sensível à oxidação: o tempo longo de correlação é de 2,3 ns na LDL Nativa e diminui para 1,6 ns para a ox-LDL com íons de Cobre e para fsLDL (725 μJ) o que mostra que a cinética de rotação na região do triptofano nessas amostras é mais rápido. Já os valores obtidos para a fsLDL (350 μJ) está próximo ao valor obtido para FeLDL, o que mostra que uma oxidação mais branda apresenta uma cinética de rotação na região do triptofano mais lenta. A anisotropia residual (A_∞) em longos tempos é diferente de zero, variando de 0,134 na LDL Nativa para 0,177 em FeLDL. Esses valores grandes originados a partir do ajuste do decaimento anisotropia experimental é devido ao fato de que o resíduo é parte de uma proteína com o tempo de difusão de rotação muito longo, de modo que o resíduo do triptofano (tempo de vida de ~ 4 ns) decai antes da queda da macromolécula como um todo. Portanto, observa-se que as alterações estruturais nas partículas de LDL promovidas por oxidações afetaram a sua dinâmica de rotação.

Tabela 13 - Valores obtidos para anisotropia das partículas de LDL com emissão em 350 nm.

	Φ_1 (ns)	Φ_2 (ns)	a_1	a_2	A_∞
LDL Nativa	0,047	2,3	0,23	0,045	0,134
FeLDL	0,037	1,8	0,26	0,042	0,177
CuLDL	0,028	1,6	0,27	0,058	0,153
fsLDL (350 μ J)	0,040	1,9	0,20	0,042	0,134
fsLDL (712 μ J)	0,040	1,6	0,29	0,039	0,157
Triptofano	0,076		0,29		0,0

A partir da análise da absorção dos antioxidantes, da formação dos compostos da peroxidação lipídica e das medidas com relação à modificação sofrida pela proteína apoB-100, pode-se dizer que a irradiação com laser de pulsos ultracurtos gerou uma oxidação da partícula de LDL. Comparando essa oxidação com a oxidação promovida pelos íons metálicos observa-se que a oxidação é mais branda nas amostras irradiadas com laser de femtossegundos.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho estudou-se as propriedades ópticas do complexo EuCTc na presença da LDL nativa e da LDL em seu estado oxidado. Na primeira etapa do trabalho analisou-se uma possível interferência da diálise da LDL na emissão do complexo EuCTc e verificou-se que para a LDL dialisada em PBS, PBS+EDTA ou não dialisada não há modificação na emissão do complexo. Posteriormente foram obtidas as curvas de calibração para o complexo EuCTc na presença da LDL nativa, da CuLDL e FeLDL e também do complexo com o íon interferente com a CuLDL. As curvas de calibração indicam que o complexo EuCTc é um bom biossensor para quantificação da LDL nativa e oxidada.

Nesse trabalho estudou-se a emissão do corante ThT na presença da LDL nativa e da LDL oxidada. A emissão da ThT na presença da LDL nativa apresentou um aumento linear com o aumento da concentração de LDL, apresentando um baixo limite de detecção e baixo limite de quantificação. A emissão da ThT na presença tanto da FeLDL e da CuLDL também apresentaram uma relação linear com o aumento da concentração da LDL, novamente com limites de detecção e quantificação baixos. Comparando-se a emissão do corante na presença da LDL nativa e da CuLDL observou-se que a emissão da ThT é maior quando está com a CuLDL, isso ocorre porque a ThT apresenta uma maior afinidade com a LDL oxidada devido à formação de estruturas semelhantes as fibrilas de amiloidose.

A partir dos valores obtidos para os limites de detecção e quantificação para o EuCTc e para ThT observou-se que o corante ThT apresenta limites de detecção e quantificação inferiores que o complexo EuCTc. Entretanto o complexo EuCTc necessitou de menos medidas e apresenta um pico de emissão mais estreito e bem definido, e o sensor EuCTc utiliza-se uma menor quantidade de LDL em cada medida.

Na terceira etapa do trabalho realizou-se um estudo sobre a emissão do complexo EuCTc e do corante ThT na presença do plasma humano. Na presença do plasma humano a emissão do complexo EuCTc apresentou uma saturação na emissão do íon Európio e um aumento na emissão da clorotetraciclina, indicando assim que a emissão do íon Európio na presença do plasma humano não é um bom biossensor para tentar quantificar a LDL, mas a emissão da clorotetraciclina apresentou resultados melhores. Já a emissão do corante ThT apresentou uma relação linear com o aumento do plasma, resultado semelhante ao encontrado com a LDL nativa. Entretanto novas medidas serão necessárias para obtermos

um melhor resultado para quantificação direta no plasma, e nesse caso um estudo com modelo animal seria importante para diminuir a influência de fatores externos, com por exemplo ingestão de remédios, alterações hormonais, e assim conseguir melhores resultados a respeito da emissão dos biossensores diretamente no plasma sanguíneo.

Na última etapa do trabalho, irradiou-se as amostras de LDL com laser de pulsos ultracurtos. A irradiação promoveu uma peroxidação lipídica da partícula de LDL e quando comparada com as amostras oxidadas por íons de Ferro e de Cobre observou-se uma oxidação mais branda para as amostras irradiadas.

6. PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

Artigos publicados e em fase de submissão.

Use of thioflavin T and Europium-Chlortetracycline as fluorescent marker of LDL modification. Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul Samad, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento. Nº 2, V. 13. (2011).

Study of LDL modification with ultrashort laser interaction. Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul Samad, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. Em fase de submissão.

Study of Tryptophan Lifetime Fluorescence to Follow the Low-Density Lipoprotein Modification. Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul Samad, Amando Siuiti Ito, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. Em fase de submissão.

Trabalhos apresentados em Congressos

“Europium Chlorotetracycline complex emission lifetime in the presence of total, native, electronegative and oxidize LDL.” Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. 2nd International Workshop on Fundamentals of Light-Matter Interaction. Porto de Galinhas-PE, Brasil 2011.

“Europium Chlortetracycline complex emission in the presence of LDL.” Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. 2nd International Workshop on Fundamentals of Light-Matter Interaction. Porto de Galinhas-PE, Brasil 2011.

“LDL quantification protocol using Europium-Chlorotetracycline complex.” Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. Encontro de Física 2011. Foz do Iguaçu-PR, 2011.

“Use of Thioflavin T and Europium-Chlorotetracycline as fluorescent marker for LDL oxidation.” Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul

Samad, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. Encontro de Física 2011. Foz do Iguaçu-PR, 2011.

“The development of a new methodology to quantify the Low Density Lipoprotein (LDL) directly from human plasma using Thioflavin T and Europium-Chlorotetracycline.” Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul Samad, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. Encontro de Física 2012. Águas de Lindóia, SP, 2012.

“Characterization of Low-Density Lipoprotein modified by ultrashort laser pulse.” Lilia Coronato Courrol, Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul Samad, Antônio Figueredo Neto. Encontro de Física 2012. Águas de Lindóia, SP, 2012.

“Use of Thioflavin T and Europium-Chlorotetracycline as biomarkers of atherosclerosis plaques and Arcus Corneus.” Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul Samad, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. Encontro de Física 2012. Águas de Lindóia, SP, 2012.

“Study of modification by ultrashort laser interaction.” Leticia Bonfante Sicchieri, Andrea Moreira Monteiro, Ricardo Elgul Samad, Antônio Figueredo Neto, Magnus Gidlund, Nilson Dias Vieira Junior, Lilia Coronato Courrol. I Brazilian winter school Biophotonics 2012. São José dos Campos, SP. 2012.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. H. ISHITANI, “Desigualdade social e mortalidade precoce por doenças cardiovasculares no Brasil” *Health*, vol. 40, no. 4, pp. 684-691, 2006.
- [2] LUSIS A. J. “Atherosclerosis.” *Nature*, vol. 407, pp. 233-241, 2000.
- [3] YOSHIDA H.; KISUGI R. “Mechanisms of LDL oxidation.” *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, vol. 411, no. 23–24, pp. 1875-82, 2010.
- [4] ITABE H., “Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis.” *Clinical reviews in allergy & immunology*, vol. 37, no. 1, pp. 4–11, 2009.
- [5] STOCKER J. R., J KEANEY . F., “Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis,” *Physiol Rev*, vol. 84, pp. 1381–1478, 2004.
- [6] ESTERBAUER H., STRIEGL G., PUHL H., ROTHENEDER M., “Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein.” *Free radical research communications*, vol. 6, no. 1, pp. 67-75, 1989.
- [7] CHATTERJEE S., BERLINER J. A, SUBBANAGOUNDER G. G., BHUNIA A. K., KOH S. “Identification of a biologically active component in minimally oxidized low density lipoprotein (MM-LDL) responsible for aortic smooth muscle cell proliferation.” *Glycoconjugate journal*, vol. 20, no. 5, pp. 331-8, 2004.
- [8] BONNEFONT-ROUSSELOT D. “Gamma radiolysis as a tool to study lipoprotein oxidation mechanisms.” *Biochimie*, vol. 86, no. 12, pp. 903-911, 2004.
- [9] NEGRE-SALVAYRE A., ALOMAR Y., TROLY M., SALVAYRE R. “Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. III. The protective effect of antioxidants (probucol, catechin, vitamin E) against the cytotoxicity of oxidized LDL occurs in in two different ways.” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1096, no. 4, pp. 291-300, 1991..
- [10] SILVA F. R. O., MONTEIRO A. M., FIGUEIREDO NETO A. M., GIDLUND M., VIERA JUNIOR N. D., COURROL L. C. “Analytical quantification of low-density lipoprotein using europium tetracycline indicator.” *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*, vol. 24, no. 3, pp. 189-93, 2009.
- [11] GRIFFIN M. D. W. et al., “Thioflavin T fluorescence in human serum: correlations with vascular health and cardiovascular risk factors.” *Clinical biochemistry*, vol. 43, no. 3, pp. 278-86, 2010.
- [12] CORDOVA C. M.M., et al. “Avaliação da Dosagem Direta do Colesterol-LDL em Amostras de Sangue de 10 . 664 Pacientes em Comparação com o uso da Fórmula de Friedewald.” *Arq. Bras. Cardiol*, v. 83, nº 6, pp. 467-481 2004.

- [13] TEIXEIRA L. D. S. et al., "Enhancement on the Europium emission band of Europium chlortetracycline complex in the presence of LDL." *Analytical biochemistry*, vol. 400, no. 1, pp. 19-24, 2010.
- [14] GROENNING M. et al. "Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils." *Journal of structural biology*, vol. 159, no. 3, pp. 483-97, 2007.
- [15] LEVINE H., "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer ' s disease @ - amyloid peptides : Detection of amyloid aggregation in solution." *Pharmaceutical Research*, pp. 404–410, 1993.
- [16] STEWART C. R. et al., "Oxidation of low-density lipoproteins induces amyloid-like structures that are recognized by macrophages." *Biochemistry*, vol. 44, no. 25, pp. 9108-16, Jun. 2005.
- [17] NELSON D.L., COX M. *Lehninger Princípios de Bioquímica, Ed. Sarvier 3^o Edição, pp 53-60, 1995.*
- [18] RADER D. J., HOBBS H. H., Disorders of lipoprotein metabolism. Capítulo 18. pp. 333-353.
- [19] HALPERN M. J. "*Lipids and atherosclerosis.*" vol. 16, no. 6., pp. 509-710. 1995
- [20] LALLA O. F., GOFMAN J. W., "Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins." *Methods of biochemical analysis*, vol. 1, pp. 459-78, 1954.
- [21] ALVES R. J., DIAMENT J., AMÂNCIO R. F., FORTI N., MARANHÃO R. C., "Ausência de Efeito do Captopril no Metabolismo de uma Emulsão Lipídica Artificial Semelhante aos Quilomícrons em Pacientes Hipertensos e Hipercolesterolêmicos." *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 83, no. 6, pp. 508-511, 2004.
- [22] SILVA A. N. "Quantificação de Lipoproteínas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)." Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo. 2008.
- [23] CASTELLI W. P. et al. "HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study." *Circulation*, vol. 55, no. 5, pp. 767-772, 1977.
- [24] HEVONOJA T., PENTIKÄINEN M. O., HYVÖNEN M. T., KOVANEN P. T., ALA-KORPELA M. "Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1488, no. 3, pp. 189-210, 2000.
- [25] PRASSL R., LAGGNER P. "Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges." *European biophysics journal : EBJ*, vol. 38, no. 2, pp. 145-58, 2009.

- [26] BATLOUNI M., “Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária.” *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 68, no. nº 1, 1997.
- [27] SEGREST J. P., JONES M. K., LOOF H., DASHTI N., “Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins.” *Journal of lipid research*, vol. 42, no. 9, pp. 1346-67, 2001.
- [28] GIEBAUF A., WICKERNB B. V., SIMATB T., STEINHARTB H., AND ESTERBAUER H. “Formation of N-formylkynurenine suggests the involvement of apolipoprotein B-100 centered tryptophan radicals in the initiation of LDL lipid peroxidation.” *Advances*, vol. 389, pp. 136-140, 1996.
- [29] GIELBAUF A., STEINER E., ESTERBAUER H. “Biophysica Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL.” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1256, pp. 221-232, 1995.
- [30] GONNELLI M., STRAMBINI G. B., “Phosphorescence lifetime of tryptophan in proteins.” *Biochemistry*, vol. 34, no. 42, pp. 13847-57, 1995.
- [31] SWAMINATHAN R., KRISHNAMOORTHY G., PERIASAMY N., “Similarity of fluorescence lifetime distributions for single tryptophan proteins in the random coil state.” *Biophysical journal*, vol. 67, no. 5, pp. 2013-23, 1994.
- [32] LAKOWICZ J. R., FRESHWATER G., WEBER G. “Nanosecond segmental mobilities of tryptophan residues in proteins observed by lifetime-resolved fluorescence anisotropies.” *Biophysical journal*, vol. 32, no. 1, pp. 591-601, 1980.
- [33] STEINBERG D. “The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update.” *Journal of lipid research*, vol. 50 Suppl, pp. S376-81, 2009.
- [34] DAUGHERTY A., DUNN, J. L. , RATERI D. L., HEINECKE J. W. “Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions.” *J Clin Invest*, vol. 94, no. 1, pp. 437-444, 1994.
- [35] YLÄ-HERTTUALA S. et al. “Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man.” *The Journal of clinical investigation*, vol. 84, no. 4, pp. 1086-95, 1989.
- [36] WANG L. J., LEE T. S., LEE F. Y., PAI R. C., CHAU L. Y. “Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions.” *The American journal of pathology*, vol. 152, no. 3, pp. 711-20, 1998.
- [37] AVOGARRO P., BON G. B.,CAZZOLATO G. “Presence of a modified low density lipoprotein in humans.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 8, no. 1, pp. 79-87, 1988.

- [38] STOCKER R. KEANEY J. F., "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." *Physiological reviews*, vol. 84, no. 4, pp. 1381-478, 2004.
- [39] HALLIWELL B. "Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?" *Cardiovascular research*, vol. 47, no. 3, pp. 410-8, 2000.
- [40] LIMA E. S. ABDALLA D. S. P. "Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 37, pp. 293-303, 2001.
- [41] MARCU L. et al. "In vivo detection of macrophages in a rabbit atherosclerotic model by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy." *Atherosclerosis*, vol. 181, no. 2, pp. 295-303, 2005.
- [42] MARCU L. et al. "Detection of rupture-prone atherosclerotic plaques by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy." *Atherosclerosis*, vol. 204, no. 1, pp. 156-64, 2009.
- [43] SKALEN K. et. al. "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis Total cholesterol." *Nature*, vol. 417, no. pp. 750-755, 2002.
- [44] GOLDBOURT U. NEUFELD H. N. "Genetic aspects of arteriosclerosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 6, no. 4, pp. 357-377, 1986. [45] T. A. Lusis, A. J., Weinreb, A. & Drake, "A textbook of Cardiovascular Medicine. (ed. Topol, E. J.)." pp. 2389–2413, 1998.
- [46] GRAINGER D. J. et al. "Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice." *Nature*, vol. 370, pp. 460-462, 1994.
- [47] Miles A.L. "A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a)." *Nature*, vol. 339, pp. 301-303, 1989.
- [48] HAJJAR K. A. et al. "Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis." *Nature*, vol. 339, pp. 303-305, 1989.
- [49] SCANU A.M, GUNTHER M.F. "Lipoprotein (a) Heterogeneity and Biological Relevance." *J. Clin. Invest.*, vol. 85, pp. 1709-1715, 1990.
- [50] DANGAS G. et al., "Lipoprotein(a) and inflammation in human coronary atheroma: association with the severity of clinical presentation." *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 32, no. 7, pp. 2035-42, 1998.
- [51] GOLDSTEIN J. L. et al. "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 1, pp. 333-7, 1979.

- [52] PARASASSI T. et al. "Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-)." *Free radical biology & medicine*, vol. 31, no. 1, pp. 82-9, 2001.
- [53] PAIVA M. S. "Proteína C-Reativa como Marcador Prognóstico." *Arq. Bras. Cardiol*, vol. 14, no. 1, pp. 71-75, 2006.
- [54] SAEED S. M. AND. FINE , "Thioflavin-T for amyloid detection." *American journal of clinical pathology*, vol. 47, no. 5, pp. 588-93, 1967.
- [55] XAVIER F., "Amiloidose." Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Ciências da saúde mestrado integrado em medicina. 2008.
- [56] SERPELL L. C., P. E. FRASER, AND M. SUNDE, "X-ray fiber diffraction of amyloid fibrils." *Methods in enzymology*, vol. 309, pp. 526-36, 1999.
- [57] PIVA J. P. J., "Comparação analítica de valores de LDL-colesterol utilizando a dosagem direta e o cálculo pela fórmula de Friedewald." *RBAC* , vol. 40, no. 4, pp. 279-283, 2008.
- [58] FRIEDEWALD W. T., LEVY R. I., FREDRICKSON D. S., "Estimation of the concentration of Low-Density Lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." *Clinical chemistry*, vol. 18, no. 6, pp. 499-502, 1972.
- [59] FEI H. et al. "Evaluation of two different homogeneous assays for LDL-cholesterol in lipoprotein-X-positive serum." *Clinical chemistry*, vol. 46, no. 9, pp. 1351-6, 2000.
- [60] ASSMANN G. Jabs H. U., NOLTE W. SCHRIEWER H. "Precipitation of LDL with sulphopolyanions: a comparison of two methods for LDL cholesterol determination.." *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, vol. 22, no. 11, pp. 781-5, 1984.
- [61] SHAIKH M. MILLER N. E. "Evaluation of a commercial reagent for precipitating human serum low-density lipoprotein." *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, vol. 152, no. 1-2, pp. 213-7, 1985.
- [62] SIEKMEIER R., MÄRZ W. GROSS W. "Precipitation of LDL with sulfated polyanions: three methods compared." *Clinica Chimica Acta*, vol. 177, no. 3, pp. 221-230, 1988.
- [63] SIEKMEIER R., MÄRZ W. GROSS W "Insufficient Accuracy and Specificity of Polyanion Precipitation Methods for Quantifying." *Clin Chem*. vol. 36, no. 12, pp. 2109-2113, 1990.
- [64] PISANI T. et al. "Accurate direct determination of low-density lipoprotein cholesterol using an immunoseparation reagent and enzymatic cholesterol assay." *Archives of pathology & laboratory medicine*, vol. 119, no. 12, pp. 1127-35, 1995.

- [65] VUJOVIC A. et al., "Evaluation of different formulas for LDL-C calculation." *Lipids in health and disease*, vol. 9, p. 27, 2010.
- [66] WARNICK G. R. NAUCK M. RIFAI N. "Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays." *Clinical chemistry*, vol. 47, no. 9, pp. 1579-96, 2001.
- [67] BÜNZLI J. C. G. "Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging." *Chemical reviews*, vol. 110, no. 5, pp. 2729-55, 2010.
- [68] MOORE E. G., SAMUEL A. P. S. RAYMOND K. N., "From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence," *Sciences-New York*, vol. 42, no. 4, pp. 542-552, 2010.
- [69] MALTA O. L. et al., "Experimental and theoretical study of ligand field, 4f–4f intensities and emission quantum yield in the compound Eu(bpyO₂)₄(ClO₄)₃." *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 323–324, pp. 654-660, 2001.
- [70] ROCHA S. M. R. "Síntese e caracterização de precursores para catalisadores termicamente estáveis à base de lantanídeos pelo método sol - gel." Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares. Autoarquia Associada a Universidade de São Paulo. 2005.
- [71] MULLER.G. "Luminescent chiral lanthanide(III) complexes as potential molecular probes." *Dalton transactions* , no. 44, pp. 9692-707, 2009.
- [72] CARNALL W. T. "The Absorption and Fluorescence spectra of rare earths. In: Handbook on the physics and chemistry of Rare Earths." K.A. Gschneider Jr. v. 3, 1979.
- [73] GONÇALVES R. R., "Preparação e Caracterização de Filmes óxidos contendo componentes opticamente ativos." Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho. 2001. [74] B. Y. J. H. Boothe, "Chemistry of the Tetracycline Antibiotics. I. Quaternary Derivatives," vol. 4981, no. 5, 1966.
- [75] NELSON M. L., "Chemical and Biological Dynamics of Tetracyclines." *Advances in Dental Research*, vol. 12, no. 1, pp. 5-11, 1998.
- [76] COIBION C., LASZLO P., "Binding of the alkali metal cations to tetracycline." *Biochemical pharmacology*, vol. 28, no. 8, pp. 1367-72, 1979.
- [77] A. ALBERT, "Avidity of Terramycin and Aureomycin for Metallic Cations." *Nature*, vol. 172, no. 4370, pp. 201-201, 1953.
- [78] MAIA E.C.P et al. "Tetraciclina e glicilcilinas: Uma visão Geral." *Quim. Nova*. vol. 33, no. 3, pp. 700-706, 2010.

- [79] HIRSCH L. et al. "Characteristics of the binding of europium(III) to tetracycline." *Analytica Chimica Acta*, vol. 166, pp. 207-219, 1985.
- [80] LEIF R. C. et al. "Increasing the Luminescence of Lanthanide Complexes." *Cytometry A* vol. 778, pp. 767-778, 2006.
- [81] COURROL L. C. SAMAD R. E. "Applications of Europium Tetracycline Complex: A Review." *Current Pharmaceutical Analysis*, vol. 4, no. 4, pp. 238-248, 2008.
- [82] ARNAUD N. et al. "Comprehensive study of the luminescent properties and lifetimes of Eu³⁺ and Tb³⁺ chelated with various ligands in aqueous solutions: influence of the synergic agent, the surfactant and the energy level of the ligand triplet." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 59, no. 8, pp. 1829-1840, 2003.
- [83] RAKICIOGLU Y. PERRIN J. H. SCHULMAN S. G., "Europium tetracycline as a luminescent probe for nucleoside phosphates and its application to the determination of kinase activity." *Chemistry*, vol. 13, no. 15, pp. 4342-9, 2007.
- [84] M. SCHÄFERLING AND O. S. WOLFBEIS, "Europium tetracycline as a luminescent probe for nucleoside phosphates and its application to the determination of kinase activity.," *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, vol. 13, no. 15, pp. 4342-9, Jan. 2007.
- [85] ZHU X., WANG X., JIANG C., "Spectrofluorimetric determination of heparin using a tetracycline-europium probe." *Analytical biochemistry*, vol. 341, no. 2, pp. 299-307, 2005.
- [86] KELIENYI G., "On the Histochemistry of Azo Group-Free Thiazole Dyes." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 15, no. 3, pp. 172-180, 1967
- [87] MASKEVICH A. A et al. "Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form." *Journal of proteome research*, vol. 6, no. 4, pp. 1392-401, 2007.
- [88] STSIAPURA V. I. et al. "Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state." *The journal of physical chemistry. A*, vol. 111, no. 22, pp. 4829-35, 2007.
- [89] STSIAPURA V. I. et al. "Charge Transfer Process Determines Ultrafast Excited State Deactivation of Thioflavin T in Low-Viscosity Solvents." *J. Phys. Chem. A*, vol. 114, pp. 8345-8350, 2010.
- [90] STSIAPURA V. I. et al. "Thioflavin T as a molecular rotor: fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity." *The journal of physical chemistry. B*, vol. 112, no. 49, pp. 15893-902, 2008.

- [91] HAIDEKKER M. A. "Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamentals and Molecular Design" Springer Ser Fluoresc. v.8 pp. 267–308, 2010
- [92] HILPERN J. W., PORTER G. STIEF L.J. "Decay of the Triplet State. I. First-Order Processes in Solution." *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 277, no. 1371, pp. 437-447, 1964.
- [93] GRABOWSKI Z. R., ROTKIEWICZ K., RETTIG W., "Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures." *Chem Inform*, vol. 34, no. 52, 2003.
- [94] GLASBEEK M., ZHANG H., "Femtosecond Studies of Solvation and Intramolecular Configurational Dynamics of Fluorophores in Liquid Solution." *Chem Inform*, vol. 35, no. 24, 2004.
- [95] P. S. VASSAR, C. F. CULLING, "Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues." *Archives of pathology*, vol. 68, pp. 487-98, Nov. 1959.
- [96] XAVIER F., "Amiloidose." Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Ciências da saúde mestrado integrado em medicina. 2008.
- [97] KHURANA R. et al., "Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils." *Journal of structural biology*, vol. 151, no. 3, pp. 229-38, 2005.
- [98] KREBS M. R. H., BROMLEY E. H. C., AND DONALD A M., "The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications." *Journal of structural biology*, vol. 149, no. 1, pp. 30-7, 2005.
- [99] SULATSKAYA A. I., KUZNETSOVA I. M., TUROVEROV K. K., "Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye." *The journal of physical chemistry. B*, vol. 115, no. 39, pp. 11519-24, 2011.
- [100] J. R. HOBBS, A. D. MORGAN, "FLUORESCENCE MICROSCOPY WITH THIOFLAVINE-T IN THE DIAGNOSIS OF AMYLOID." *The Journal of pathology and bacteriology*, vol. 86, pp. 437-42, Oct. 1963
- [101] KLUNK W. E.. et. al. "Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain." *Life Sciences*, vol. 69, pp. 1471-1484, 2001.
- [102] STRICKLAND D., MOUROU G., "Compression of amplified chirped optical pulses." *Optics Communications*, vol. 56, no. 3, pp. 219-221, 1985.
- [103] CORDEIRO T.S., "Estudo da propagação de pulsos Laser através de um Sistema Amplificador de Pulsos Ultracurtos para o Desenvolvimento de um Alargador

Temporal do tipo Öffner.” Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade De São Paulo. 2009.

- [104] MOULTON P. F. “Spectroscopic and laser characteristics of Ti:Al₂O₃.” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 3, no. 1, p. 125, 1986.
- [105] REIF J., COSTACHE F., “Femtosecond laser interaction with solid surfaces: explosive ablation and self-assembly of ordered nanostructures,” In *Advances in Atomic Molecular, and Optical Physics*, v. 53, G. Rempe and M. O. Scully, eds. (Elsevier Academic Press Inc.), pp. 227–251. 2006
- [106] C. L. ARNOLD, A HEISTERKAMP, W. ERTMER, AND H. LUBATSCHOWSKI, “Computational model for nonlinear plasma formation in high NA micromachining of transparent materials and biological cells.,” *Optics express*, vol. 15, no. 16, pp. 10303–17, 2007.
- [107] PAL S. K., PEON J., BAGCHI, B. ZEWEIL A. H., “Biological Water: Femtosecond Dynamics of Macromolecular Hydration,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 106, no. 48, pp. 12376-12395, 2002.
- [108] ZEWEIL A. H. “Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond ” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 104, no. 24, pp. 5660-5694, 2000
- [109] SCHREIER W. J. et al., “Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction.” *Science*, vol. 315, no. 5812, pp. 625-9, 2007.
- [110] HATAM L. J. KAYDEN H. J. “A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood.” *Journal of lipid research*, vol. 20, no. 5, pp. 639-45, 1979.
- [111] SPRANGER T. “How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper.” *Chemistry and physics of lipids*, vol. 91, no. 1, pp. 39-52, 1998.
- [112] PENG Q. “Fluorimetric study of the interaction between nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and tetracycline–europium complex and its application.” *Analytica Chimica Acta*, vol. 549, no. 1–2, pp. 26-31, 2005.
- [113] F. R. DE O. SILVA, “Desenvolvimento de um biossensor de peróxido de hidrogênio de baixo custo baseado na emissão do Európio III.” Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2008.
- [114] GÓMEZ S. L. et al. “Cu and Fe metallic ions-mediated oxidation of low-density lipoproteins studied by NMR, TEM and Z-scan technique.” *Chemistry and physics of lipids*, vol. 163, no. 6, pp. 545-51, 2010.
- [115] CHERRY R. J., CHAPMAN D., AND LANGELAAR J., “Fluorescence and phosphorescence of Betacarotene.” *Transactions of the Faraday Society*, vol. 64, p. 2304, 1968.

- [116] JANERO D. R., “Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.” *Free radical biology & medicine*, vol. 9, pp. 515-540, 1990.
- [117] RIOS F. J. O., “Sinalização intracelular e expressão de receptores mediados por LDL modificada e peptídeos da apolipoproteínaB-100 em monócitos / macrófagos humanos.” Tesde de doutorado apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 2009.
- [118] R. INSLILATTE AND N. YOVJZ, “Fractionation of Lipoproteins from blood by gel filtration,” *Journal of Chromatography*, vol. 25, pp. 63–70, 1966.
- [119] D. L. SPARKS AND M. C. PHILLIPS, “Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis.,” *Journal of lipid research*, vol. 33, no. 1, pp. 123–30, Jan. 1992.
- [120] SOUZA E. S., HIRATA I. Y., JULIANO L., AND ITO A. S., “End-to-end distance distribution in bradykinin observed by Förster resonance energy transfer,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - General Subjects, vol. 1474, no. 2, pp. 251-261, 2000.