UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química

Avaliação Química e Termoanalítica de Cálculos Biliares
E
Bile Vesicular Humana de Pacientes do Sexo Masculino

Cláudia Mônica Tortorelli
Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos

São Paulo
Nove de dezembro de 2005

“Avaliação química e termoanalítica de cálculos biliares e bile vesicular humana de pacientes do sexo masculino”

CLÁUDIA MÔNICA TORTORELLI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Química - Área: Química Analítica.

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. JIVALDO DO ROSARIO MATOS
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. LILIANA MARZORATI
IQ – USP

Prof. Dr. LUIS MARCELO INACO CIRINO
HU – USP

SÃO PAULO
23 DE FEVEREIRO 2005

*Agradeço a Deus,
pelo dom da vida , por ter me concedido saúde e discernimento
nos momentos mais difíceis
por ter me dado um lar, pais que se amam,
e que sempre incentivaram meus projetos,
que me ensinaram o valor da família,
da amizade e do amor ao próximo.
Pelo meu “presentinho do céu”, a Sophia, que é uma luz e uma bênção,
um exercício diário de amor, firmeza e tolerância.*

Muito, Muito Obrigada!

*Dedico este trabalho aos meus pais,
ainda que mamãe não esteja entre nós, sinto sua presença sempre
e me lembro de seus conselhos.
Ao meu pai, que tem sido um super avô para Sophia
e muito prestativo e compreensivo enquanto eu realizava este trabalho.
Aos meus irmãos, Bia e Ale,
sempre prontos a ajudar (em todos os sentidos).
Ao Luis, presente nas horas boas e más,
E a Sophia... a quem dedico todo meu projeto de vida!*

Agradecimentos

Ao Instituto de Química da USP, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Ao Luís, por me incentivar a desenvolver meu “potencial adormecido”.

Ao amigo Meri, da Oxiteno pela obtenção e interpretação dos espectros IV.

Ao Flávio, da Geociências, pelas análises e interpretação do DRX.

A técnica Maria da Graça, da Oxiteno pela valiosa ajuda na liofilização das bile.

Aos amigos do LATIG, que sempre estão dispostos a ajudar: Luis, Nara, Adriano, Omara, Thaís, Carol, Marco, Floripes e todo pessoal que está iniciando.

Ao pessoal da secretaria e do centro cirúrgico do HCU-USP, pela coleta do material e das intenções cirúrgicas.

Ao Marcelo (da Dani), por ter “scaneado” os espectros de RMN.

Aos meus tios Sandra e Sadi, padrinhos da Sophia, por sempre cuidarem dela quando precisei.

Aos pacientes doadores dos cálculos.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e deixaram comigo alguma lição: amigos, parentes, professores e alunos.

Obrigada por estarem presente nesta jornada!

*E especialmente, aos meus orientadores
Prof Dr Jivaldo e Profa Dra Lucildes,
pela dedicação, estímulo, amor e entusiasmo pelo trabalho.*

Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Pág
Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
 CAPÍTULO 1.....	 01
1. Introdução e Objetivos.....	02
 CAPÍTULO 2.....	 04
2. Considerações Gerais.....	05
Técnicas Analíticas Utilizadas na Caracterização	
2.1. Térmica.....	05
2.1.1. Análise Elementar (AE).....	05
2.1.2. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS).....	06
2.1.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	07
2.1.3.1. RMN de Próton (RMN ^1H).....	08
2.1.3.2. RMN de Carbono-13 (RMN ^{13}C).....	08
2.1.4. Difratometria de Raios X (DRX).....	09
2.1.4.1. Preparação de amostra para DRX.....	10
2.1.4.2. Interpretação dos padrões de DRX.....	10
2.1.5. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	12

Técnicas Analíticas Utilizadas na Caracterização	
2.2. Térmica.....	17
2.2.1. Introdução à Análise Térmica.....	17
2.2.2. Termogravimetria (TG)/ Termogravimetria Derivada (DTG).....	17
2.2.2.1. Termogravimetria (TG).....	18
2.2.2.2. Termogravimetria Derivada (DTG).....	20
2.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	21
2.2.3.1. DSC de Fluxo de Calor.....	21
2.2.3.2. DSC de Compensação de Potência.....	21
2.2.3.3. As curvas Dta/DSC.....	22
2.3. Considerações Gerais sobre Colelitíase.....	23
 CAPÍTULO 3	 30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Materiais	31
3.1.1. Matérias-Primas.....	31
3.2. Métodos.....	32
3.2.1. Metodologia de Amostragem.....	32
3.3. Métodos de Análises.....	33
3.3.1.Caracterização Química.....	33
3.3.1.1.Análise Elementar.....	33
3.3.1.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).....	33
3.3.1.3.Difratometria de Raios X (DRX).....	34
3.3.1.4.Espectrometria de Absorção Atômica.....	34

3.3.1.4.1.Digestão Total das Amostras.....	35
3.3.1.5.Ressonância Magnética Nuclear.....	35
3.3.2.Estudo Termoanalítico.....	36
3.3.2.1.Termogravimetria (TG)/Termogravimetria Dervada (DTG).....	36
3.3.2.2.Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	37
CAPÍTULO 4	39
4. Resultados e Discussão.....	40
4.1. Aspectos Gerais sobre as Amostras de Cálculos Biliares e Bile.....	40
4.2. Caracterização Físico-Química.....	42
4.2.1.Análise Elementar.....	43
4.3. Amostras de Cálculos Biliares que Corroboram com a Classificação Proposta por Mercuri em 2002.....	47
4.3.1.Grupo A.....	47
4.3.1.1. Estudo termoanalítico das Amostras do Grupo A	47
4.3.1.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	50
4.3.1.3.Difração de Raios X.....	51
4.3.1.4.Espectrometria de Absorção Atômica.....	53
4.3.1.5.Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	54
4.3.2.Grupo F.....	58
4.3.2.1. Estudo termoanalítico das Amostras do Grupo F	58
4.3.2.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	60
4.3.2.3.Difração de Raios X.....	61

4.3.2.4.Espectrometria de Absorção Atômica.....	61
4.3.3.Grupo Intermediário C/D (C ₁).....	63
4.3.3.1.Estudo termoanalítico das Amostras do Grupo C ₁	63
4.3.3.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	65
4.3.3.3.Difração de Raios X.....	66
4.3.3.4.Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)	67
4.3.4.Amostras onde não há Concordância com a Classificação Proposta por Mercuri em 2000.....	68
4.3.4.a. Amostra C06.....	68
4.3.4.a.1.Estudo termoanalítico da Amostras C06.....	68
4.3.4.a.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	70
4.3.4.a.3.Difração de Raios X.....	71
4.3.4.b. Amostra C10.....	72
4.3.4.b.1.Estudo termoanalítico da Amostras C10.....	72
4.3.4.b.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	74
4.3.4.b.3. Difração de Raios X.....	75
4.3.4.c. Amostra C12.....	75
4.3.4.c.1.Estudo termoanalítico da Amostras C12.....	76
4.3.4.c.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	77
4.3.4.c.3.Difração de Raios X.....	77
4.3.4.d. Amostra C13.....	78
4.3.4.d.1.Estudo termoanalítico da Amostras C13.....	79

4.3.4.d.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	80
4.3.4.d.3.Difração de Raios X.....	81
4.3.4.e. Amostra C15.....	82
4.3.4.e.1.Estudo termoanalítico da Amostras C15.....	82
4.3.4.e.2.Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	83
4.3.4.e.3.Difração de Raios X.....	83
4.3.4.4.Espectrometria de Absorção Atômica (AAS).....	85
4.4. Biles.....	86
 CAPÍTULO 5	 88
5. Considerações Finais.....	89
 CAPÍTULO 6	 91
6. Referências Bibliográficas.....	92
 APÊNDICE A – Curvas TG/DTG e DSC	 98
APÊNDICE B – Resultados de AAS	102
APÊNDICE C – Espectros RMN	103
 CURRICULUM VITAE	 104

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 2.1. Difração de Raios X por um cristal.....	11
Figura 2.2. Espectro de absorção na região do infravermelho de uma amostra de padrão de colesterol.....	13
Figura 2.3. Tipos de Vibrações Moleculares. Onde (+) indica movimento para fora da página e (-) indica movimento para dentro da página.....	14
Figura 2.4. Diagrama de Energia Potencial. Curva a: Oscilador Harmônico; Curva b: Oscilador Anarmônico.....	16
Figura 2.5. Demonstração dos perfis das curvas TG: a) TG isotérmica; b) TG queise-isotérmica; c) TG dinâmica ou convencional.....	19
Figura 2.6. Quantidades relativas de sais biliares <i>versus</i> quantidades de fosfolípidos são essenciais à cristalização do colesterol através de bile supersaturada.....	29
Figura 3.1. Codificação das amostras de cálculo biliar (C) e bile vesicular (B) e seus respectivos números de coleta.....	31
Figura 3.2. Curva TG/DTG para uma amostra padrão de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Os valores em negrito são as porcentagens calculadas e os outros valores são experimentais.....	37
Figura 3.3. Curva DSC de aquecimento e resfriamento de uma amostra padrão de Índio metálico utilizado para verificação das condições do equipamento.....	38
Figura 4.1. Fotos dos cálculos C10 e C14 respectivamente. Amostras que apresentam heterogeneidade tanto na distribuição de cores quanto no tamanho de cálculos.....	40
Figura 4.2. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C08, representativa do grupo A.....	49
Figura 4.3. Fórmula estrutural do Colesterol.....	50
Figura 4.4. Espectros FTIR das amostras C08 e C09 classificadas como grupo A, que apresentam bandas bem caracterizadas para colesterol e bandas de bilirrubinato de cálcio não tão expressivas na amostra C08.....	51
Figura 4.5. Fotos dos cálculos C01 e C11 respectivamente. Amostras do grupo A, que apresentam cristalinidade visível a olho nú.....	52

Figura 4.6.	Fotos dos cálculos C02 e C08 respectivamente. Amostras do grupo A, que possuem aspecto pastoso e não apresentam cristalinidade visível a olho nú.....	52
Figura 4.7.	Difratograma de Raios X, pelo método de pó, da amostra C08, exemplo de cálculo biliar do grupo A, que apresenta formação cristalina de colesterol.....	53
Figura 4.8.	Fórmula Estrutural do colesterol com carbonos e grupos funcionais assinalados com letras.....	55
Figura 4.9.	Fórmula Estrutural do colesterol com carbonos numerados.....	56
Figura 4.10.	Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C04, representativa do grupo F.....	59
Figura 4.11.	Curvas TG comparativas das amostras de cálculos biliares C04 e C05 pertencentes ao grupo F.....	59
Figura 4.12.	Espectros FTIR das amostras C04 e C05 classificadas como grupo F, que apresentam bandas características para bilirrubbato de cálcio e para bilirrubbina.....	60
Figura 4.13	Difratogramas das amostras de cálculos C04 e C05 que são consideradas amorfos, não apresentando formação de cristais.....	61
Figura 4.14.	Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C03, representativa do grupo denominado C ₁	64
Figura 4.15.	Curvas TG comparativas das amostras de cálculos biliares C03 e C07 pertencentes ao grupo denominado C ₁	65
Figura 4.16.	Espectros FTIR das amostras C03 e C07 classificadas como grupo C ₁ , que apresentam bandas características para colesterol, bilirrubbato de cálcio e bilirrubbina.....	66
Figura 4.17.	Difratogramas de Raios X, das amostras C03 e C07, que apresentam cristalinidade relativa ao colesterol e foram classificadas como grupo C ₁	67
Figura 4.18.	Curvas TG/DTG da amostra de cálculo biliar C06, obtida em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar, com indicação das etapas de perda de massa e suas porcentagens.....	69
Figura 4.19.	Curva DSC da amostra de cálculo biliar C06, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica N ₂	70

Figura 4.20.	Espectros da amostra de cálculos C06 que apresenta CaCO_3 cristalizado sob forma de Aragonita e padrão de Aragonita da biblioteca de dados.....	71
Figuras 4.21.	Difratograma da amostra de cálculo biliar C06 que apresenta estrutura cristalina de aragonita, muito diferente das encontradas anteriormente.....	72
Figura 4.22.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C10, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	73
Figura 4.23.	Espectros da amostra de cálculo C10, e dos respectivos resíduos após isotermas a 300°C e a 500°C	74
Figuras 4.24.	Difratograma da amostra de cálculo biliar C10 que apresenta estrutura cristalina somente de colesterol, apesar de conter apenas 1% deste.....	75
Figura 4.25.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C12, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	76
Figura 4.26.	Espectro da amostra de cálculo C12 que apresenta bandas de caracterização de bilirrubinato de cálcio, colesterol e bilirrubina.....	77
Figuras 4.27.	Difratograma da amostra de cálculo biliar C12 que apresenta estrutura cristalina somente de colesterol, apesar deste não estar evidenciado na curva DSC.....	78
Figura 4.28.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C13, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	80
Figura 4.29.	Espectro da amostra de cálculo C13 que apresenta bandas de caracterização de bilirrubinato de cálcio, bilirrubina e CaCO_3 sob a forma de Aragonita e Calcita.....	81
Figura 4.30.	Difratograma da amostra de cálculo C13 que apresenta estrutura cristalina de CaCO_3 , cristalizado sob a forma de Aragonita (vermelho) e calcita (azul).....	81
Figura 4.31.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C15, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	83
Figura 4.32	Espectro da amostra de cálculo C15 que apresenta bandas de caracterização de bilirrubinato de cálcio e bilirrubina.....	84
Figuras 4.33	Difratograma da amostra de cálculo C15 que é considerado amorfo.....	84

Figura 4.34.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile vesicular B02, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	86
Figura 4.35.	Difratograma da amostra de bile vesicular B02 que apresenta estrutura cristalina colesterol, (vermelho) e NaCl cristalizado em forma de Halita(azul).....	87
Figura 4.36.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C01, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	99
Figura 4.37.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C02, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	99
Figura 4.38.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C09, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	100
Figura 4.39.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C11, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	100
Figura 4.40.	Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C14, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.....	101

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 2.1. Valores teóricos (calculados) e experimentais (AE) dos teores de carbono e hidrogênio em um padrão de colesterol.....	05
Tabela 2.2. Regiões espectrais no Infravermelho.....	12
Tabela 3.1. Parâmetros utilizados no equipamento AAS.....	34
Tabela 3.2. Programa de aquecimento do forno de MO – 300W de potência para digestão total dos cálculos biliares.....	35
Tabela 4.1. Resultados de análise elementar (CHN) das amostras de cálculos biliares.....	42
Tabela 4.2. Comparação dos teores de CHN, determinados nos cálculos biliares pertencentes a este trabalho com aqueles encontrados por Mercuri em 2000.	44
Tabela 4.3. Teores de CHN, teórico e experimental, dos padrões das substâncias que fazem parte do processo metabólico biliar..	45
Tabela 4.4. Resultados das etapas de perda de massa por TG/DTG para os cálculos biliares.....	46
Tabela 4.5. Resultados dos valores médios para temperatura <i>onset</i> , temperatura de pico, entalpia de fusão e porcentagem estimada de colesterol nas amostras.....	49
Tabela 4.6. Principais bandas de absorção na região do Infravermelho para o padrão de colesterol.....	50
Tabela 4.7. Concentração média dos metais Cu, Cd e Pb em amostras do grupo A.....	54
Tabela 4.8. Resultados de RMN ^1H , comparando valores de deslocamento (δ) em ppm do banco de dados referente à Figura 4.8 e dos resultados experimentais das amostras C01 e C02.....	55
Tabela 4.9. Resultados de RMN ^{13}C , comparando valores de deslocamento (δ) em ppm referente à Figura 4.9 e valores experimentais das amostras C01 e C02.....	56
Tabela 4.10. Concentração média dos metais Cu, Cd e Pb em amostras do grupo F.....	62

Tabela 4.11	Concentração média dos metais Cu, Cd e Pb em amostras do grupo C ₁	67
Tabela 4.12	Concentração média dos metais Cu, Cd e Pb nas amostras C06, C10, C12, C13 e C15.....	85
Tabela 4.13	Valores das diluições utilizadas, branco, curva de calibração, média, desvio padrão, limite de detecção e concentração de Cd nas amostras.....	102
Tabela 4.14	Valores das diluições utilizadas, branco, curva de calibração, média, desvio padrão, limite de detecção e concentração de Pb nas amostras.....	102

RESUMO

Este trabalho teve como meta principal ampliar o estudo anteriormente relatado por Mercuri em 2000, agora com a caracterização química e termoanalítica de cálculos biliares e as biles vesiculares humanas, especificamente, de pacientes do sexo masculino. Para ambos os tipos de caracterização foram utilizadas várias técnicas, como: (a) Análise Elementar (AE), para determinação de teores de C, H e N. (b) Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com o objetivo de verificar as bandas de absorção no IV e assim identificar algumas substâncias que fazem parte desses materiais. (c) Difratometria de Raios X (DRX), para identificar formações cristalinas de espécies presentes nas amostras de cálculos biliares. (d) Espectrometria de Absorção Atômica (AAS), para a determinação do teor de alguns metais como por exemplo: Cd, Pb e Cu. (e) Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para ratificar a presença de colesterol e afastar a hipótese de ter-se ergosterol na amostra e (f) TG/DTG e DSC aplicadas para o estudo do comportamento térmico das amostras de cálculos biliares e biles. Este trabalho permitiu concluir que: alguns tipos de cálculos biliares do universo de pacientes do sexo masculino que foram estudados puderam ser inseridos na classificação proposta anteriormente, no entanto, cinco dessas amostras não se encaixaram em nenhum desses grupos, sugerindo, com isso, a adição de novos grupos. Verificou-se, também, que a porcentagem de cálculos biliares formados por colesterol é menor para essa classe de pacientes. Em duas amostras de cálculos biliares encontrou-se CaCO_3 cristalizado como aragonita, outra indicou a presença de fosfato de cálcio e em duas dessas amostras foram encontrados um alto teor de chumbo. No caso das biles, seis amostras indicaram a presença de NaCl (halita) e uma delas indicou, também, a presença de colesterol.

ABSTRACT

This work had as goal main to enlarge the study previously related for Mercuri in 2000, now with the chemical and thermoanalytical characterization of gallstones and the human vesicular bile, specifically, of patient of the masculine sex. For both the kinds of characterization were used several techniques, as: (a) Elementary analysis (AE), for contents determination of C, H and N. (b) Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), with objective of verifying the absorption bands in the IV and thus identify some substances that do part of these materials. (c) X-rays diffraction (DRX), to identify present crystalline species formations in the gallstones sample. (d) Atomic Absorption Spectrometry (AAS), for some metals content determination such as: Cd, Pb and Cu. (e) Nuclear Magnetic resonance (RMN), to ratify the cholesterol presence and to remove the hypothesis of have ergosterol in the sample and (f) TG/DTG and DSC applied to the gallstones and bile samples thermal behavior study. This work allowed to conclude that: some universe gallstones kinds of patient of the masculine sex that were studied could be inserted in the proposed classification previously, however, five of these samples did not case in none of these groups, suggesting, with that, the addition of new groups. It verified, also, that the gallstones percentage formatted for cholesterol is smaller for this class of patient. In two gallstones samples were found CaCO_3 crystallized as aragonite, other indicated the calcium phosphate presence and in two of these samples were found a Pb high content. In the biles case, six samples indicated presence of NaCl (halita) and their one indicated, also, the cholesterol presence.

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

*Quem nada sabe, nada ama.
Quem nada sabe, nada entende...
Mas quem entende, quem ama, quem observa,
Quem vê...Compreende que,
Quanto maior o conhecimento inerente a uma coisa,
Maior é o amor...
Tudo é embasado no conhecimento. Dele vem todo fruto!
Quem acha que todos os frutos amadurecem ao mesmo tempo,
como as cerejas...
Nada sabe a respeito das uvas!*

PARACELSO (Escritos de Nuremberg, 1528)

1. Introdução e Objetivos

Esse trabalho aborda aspectos relativos à formação dos cálculos biliares e desequilíbrio biliar, em pacientes do sexo masculino, a partir dos dados de caracterização química e termoanalítica, no intuito de dar continuidade aos estudos iniciados por Mercuri e colaboradores, em 2000.

Baseado na dificuldade deparada em encontrar na literatura trabalhos que relatem a correlação entre os aspectos químicos e clínicos e, devido ao grande interesse em prognosticar a colelitíase, a continuidade do estudo e avaliação química desses materiais, foi aqui direcionado a pacientes do sexo masculino, devido exatamente à menor incidência desse tipo de enfermidade em homens. Há quase um século a comunidade científica, mais especificamente da área médica, se preocupa em avaliar e estudar este distúrbio. A cada ano, nos Estados Unidos são detectados um milhão de novos casos, e a maioria deles resulta em intervenção cirúrgica, o que demanda gastos e inconvenientes a pacientes e hospitais (Van ERPECUM, 2004).

Durante os meses em que foram coletadas as amostras para este estudo, as intenções cirúrgicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), demonstram que a colecistectomia é a cirurgia mais realizada semanalmente.

Em sua tese de doutorado, Mercuri e colaboradores estudaram 40 tipos de cálculos biliares e os classificaram em oito grupos distintos (A, B, C, D, E, F, G e H) e mostraram nos ensaios, que além da termogravimetria (TG), a calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) pode, também, fornecer informações que auxiliam na caracterização química, como por exemplo, na definição da presença e teor de colesterol nesses materiais. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo geral ampliar a avaliação sobre os cálculos biliares e da bile vesicular humana, destacando os pacientes do sexo masculino submetidos à colecistectomia, com base na caracterização química e

termoanalítica desses produtos acabados. A opção de trabalhar apenas com materiais oriundos de pacientes do sexo masculino é exatamente devido ao maior interesse de investigar o motivo da incidência entre eles ser tão baixa, se relacionada às mulheres. Também é interessante averiguar se entre os cálculos de homens e mulheres existe ou não o mesmo tipo de predominância quanto aos cálculos caracteristicamente de colesterol. Como objetivos específicos, propomo-nos a: i) utilizar a metodologia proposta por Mercuri e adaptá-la quando necessário, sempre visando otimizar os ensaios e comparar os resultados àqueles já relatados; ii) caracterizar quimicamente esses materiais por: análise elementar (determinação dos teores de C, H, N), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR); medidas dos intervalos de fusão; difração de raios X (DRX) e teor/traços de metais pesados por espectroscopia de absorção atômica (AAS); iii) estudar o comportamento térmico das amostras, a partir da termogravimetria / termogravimetria derivada (TG/DTG) e da calorimetria exploratória diferencial (DSC); iv) buscar a correlação entre os dados de caracterização química e termoanalítica, visando um conhecimento mais aprimorado correspondente ao processo metabólico da formação dos cálculos biliares em homens e, se possível, ampliar a nova classificação proposta por Mercuri e colaboradores.

Com isto, estabeleceu-se um plano interdisciplinar envolvendo pesquisadores da área química e médica no sentido de facilitar a interpretação dos resultados, assim como, promover a continuidade e ampliação do estudo, para que a colelitíase possa ser considerada uma das doenças em extinção nesse 3^o Milênio.

Capítulo 2

Considerações Gerais

*É preciso reagrupar os saberes
Para buscar a compreensão do universo*

Edgar Morin

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1. Técnicas Analíticas Utilizadas na Caracterização Química

2.1.1. Análise Elementar (AE)

A técnica instrumental denominada análise elementar (AE) é utilizada na determinação dos teores de carbono - C, hidrogênio - H e nitrogênio - N num determinado composto a ser analisado. O ensaio é realizado colocando-se certa massa de amostra numa cápsula de estanho que é introduzida num tubo de combustão, a 925°C e sob atmosfera de O₂ (Perkin Elmer Corporation, 1999). Durante a combustão forma-se uma mistura de voláteis constituídos por CO₂, H₂O e óxidos de nitrogênio (N₂O_x). Esta mistura é arrastada por uma vazão contínua de hélio para um tubo de quartzo preenchido com cobre, que deve reduzir os N₂O_x a N₂. O tubo de combustão contém sais de prata, vanádio e tungstênio, cuja função é reter outras substâncias formadas durante a combustão. A mistura dos voláteis passa por uma coluna empacotada com sílica e os constituintes são separados por ordem de polaridade: N₂ < CO₂ < H₂O, e são detectados por um detector de condutividade térmica (MIYANO,1996).

Pode-se observar, na Tabela 2.1, uma comparação entre os valores teóricos de C e H presentes numa amostra de colesterol, calculados de acordo com sua fórmula molecular (C₂₇H₄₆O), e os valores experimentais obtidos através da análise elementar.

Tabela 2.1. Valores teóricos (calculados) e experimentais (AE) dos teores de C e H em um padrão de colesterol.

Valores	% C	% H
Teórico (calculado)	83,87	11,99
Experimental (AE)	83,89	11,78

2.1.2. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

A espectrometria de Absorção Atômica (AAS) baseia-se na medida da absorção de intensidade de radiação eletromagnética por átomos gasosos no estado fundamental. O elemento de interesse absorve a radiação incidente, proveniente de uma fonte de radiação primária que pode ser uma lâmpada de catodo oco (HCL) ou uma lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL), num comprimento de onda específico, selecionado por um monocromador. Os atomizadores utilizados com mais frequência são a chama (FAAS) e o atomizador eletrotérmico (ETAAS) (WELZ et al, 1999).

A espectrometria de Absorção Atômica (AAS) com atomização por chama (FAAS) e eletrotérmica (ETAAS), é largamente utilizada na determinação de metais, semi-metais e ametais. ETAAS é uma técnica amplamente explorada devido à capacidade de determinação de elementos traços e ultra-traços em diversos tipos de amostras. A alta especificidade, seletividade e relativa facilidade de operação são algumas características importantes que ajudam à absorção atômica a manter seu espaço ao lado de outras técnicas espectroscópicas. A excelente sensibilidade, o baixo volume de detecção, a necessidade de pequenos volumes de amostras e soluções analíticas e ainda, a possibilidade de pré-tratamento térmico *in situ* durante o ciclo de aquecimento, o que favorece a introdução direta de suspensões e sólidos no tubo de grafite, são algumas vantagens adicionais da ETAAS em relação a outras técnicas espectroanalíticas.

Também é possível acoplar ETAAS a um sistema de geração de hidretos (HG-ETAAS)(TSALEV, 2000; POHL, 2004). A HG-ETAAS é uma das técnicas utilizadas para determinação total e de espécies de elementos formadores de hidretos. O fato da formação do hidreto depender do estado de oxidação do elemento torna possível o desenvolvimento de procedimentos analíticos visando à especiação química.

A alta sensibilidade também se deve a possibilidade de pré-concentração do analito na superfície do tubo de grafite, modificado com modificador químico apropriado (NAOZUKA, 2003; SIMA, 2003).

Um modificador químico é um sal inorgânico que geralmente é coinjectado, em concentração superior a do elemento de interesse, no interior do tubo de grafite com a solução analítica de referência ou a amostra. A utilização dessas substâncias é essencial devido a possibilidade de aumentar a estabilidade térmica do elemento de interesse e reduzir a dos concomitantes, que comumente estão presentes na amostra. A modificação permanente pode ser realizada térmica ou eletroquimicamente. As vantagens agregadas a esse procedimento devem-se ao aumento da frequência analítica, melhora do limite de detecção e proteção pirolítica do tubo de grafite. Na modificação térmica, uma alíquota do modificador químico é introduzida no interior do tubo de grafite e submetida a um aquecimento que permita a deposição desse na superfície. A maior vantagem da modificação eletroquímica no trapeamento de compostos voláteis está relacionada ao aumento da área superficial modificada (NAOZUKA, 2003).

2.1.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Esta técnica está baseada na medida de absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência (RF) de cerca de 4 a 900 MHz. Diferentemente das absorções no ultravioleta, visível e infravermelho, núcleos atômicos estão envolvidos no processo de absorção, em vez de elétrons externos (SKOOG, 2002). Dois tipos gerais de espectrômetros de RMN estão atualmente em uso: ondas contínuas e ondas pulsadas, ou com transformadas de *Fourier*. Em ambos a amostra é posicionada em um forte campo magnético, com intensidade de vários *Tesla* (T). Os espectrômetros contínuos são semelhantes em princípio aos instrumentos ópticos de absorção, nos

quais um sinal de absorção é monitorado enquanto a frequência da fonte é varrida lentamente (BECKER, 1993).

2.1.3.1. RMN de Próton (RMN ^1H)

A aplicação mais importante da espectroscopia de RMN ^1H , tem sido para identificação e elucidação de moléculas orgânicas, bioorgânicas e bioquímicas. No entanto, o método também é muito útil para determinação quantitativa de espécies absorventes (FIELDS & STERNHELL, 1989). Um espectro RMN raramente é suficiente, por si só, para identificação de um composto orgânico. No entanto, em conjunto com outras observações como espectro de massa e no infravermelho, a RMN é uma ferramenta poderosa e indispensável para caracterização de compostos puros.

Um aspecto único dos espectros de RMN é a proporcionalidade direta entre as áreas dos picos e o número de núcleos responsáveis pelo pico. Como consequência, uma determinação quantitativa de um composto específico não requer amostras puras para calibração. Sendo assim, se um pico identificável de um dos constituintes de uma amostra não se superpõe aos picos de outros constituintes, a área desse pico pode ser usada para determinar a concentração da espécie diretamente, desde que a área do sinal do próton seja conhecida, que pode ser obtida convenientemente a partir de uma concentração conhecida de um padrão interno (SKOOG, 2002).

2.1.3.2. RMN de Carbono-13 (RMN ^{13}C)

A RMN ^{13}C foi estudada pela primeira vez em 1957, mas não teve seu uso generalizado até o começo dos anos 70. Esse foi o tempo necessário para o desenvolvimento de instrumentos sensíveis o suficiente para detectar os fracos sinais de RMN do núcleo de ^{13}C . A baixa intensidade do sinal resulta da baixa abundância natural do

isótopo (1,1%) e da pequena razão giromagnética, que é cerca de 0,25 vez a do próton.

Os desenvolvimentos mais importantes no aumento de sinal em RMN que conduziram diretamente a um crescimento explosivo da RMN¹³C, incluem ímãs com campos mais intensos e instrumentos com transformada de *Fourier* (KING & WILLIAMS, 1989).

A RMN ¹³C tem várias vantagens sobre a RMN de próton, no que se refere a sua potência para elucidar estruturas orgânicas e bioquímicas. A RMN de ¹³C fornece informações sobre o esqueleto das moléculas, em vez da periferia. Além disso, o intervalo de deslocamentos químicos de ¹³C em compostos orgânicos é de cerca de 200 ppm, comparado a 10 a 15 ppm para prótons. Como resultado, há menos superposições de picos em espectros de ¹³C do que nos espectros de próton (FIELDS & STERNHELL, 1989).

2.1.4. Difractometria de Raios X (DRX)

A difração de raios X tem sido uma importante fonte de informação para a ciência e a indústria. A maior parte do que é conhecido sobre espaçamento e arranjo dos átomos em materiais cristalinos foi determinada diretamente por estudos de difração. Além disso, esses estudos levaram ao entendimento das propriedades físicas dos metais, dos materiais poliméricos e outros sólidos. Esse método também fornece um meio conveniente e prático para a identificação qualitativa de compostos cristalinos.

O método de difração de raios X usando amostra policristalina, ou método do pó é único, porque somente este método analítico é capaz de fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre os *compostos* presentes em uma amostra sólida. Por exemplo, o método do pó pode determinar a porcentagem de KBr e NaCl em uma mistura sólida desses dois compostos. Outros métodos analíticos revelam a porcentagem de K⁺, Na⁺, Br⁻ e Cl⁻ na amostra.

Os métodos de raios X de pó estão baseados no fato de que o padrão de difração de raios X é específico para cada substância cristalina. Assim, se é encontrada uma concordância exata entre o padrão produzido por uma amostra desconhecida e o de uma amostra conhecida, então pode ser atribuída a identidade química a essa amostra desconhecida. (SKOOG, 2002)

2.1.4.1. Preparação da amostra para DRX

Para estudos analíticos por difração, a amostra cristalina é moída na forma de um pó fino e homogêneo. Dessa forma, um número enorme de pequenos cristais estará orientado em todas as direções possíveis; assim, quando um feixe de raios X atravessa o material, um número significativo de partículas deve estar orientado de forma a cumprir a condição de Bragg para a reflexão em todos os espaçamentos interplanares possíveis.

A amostra contida em um capilar de vidro fino ou de celofane é colocada na frente do feixe. Alternativamente, uma amostra pode ser misturada com um aglutinante não-cristalino, moldando-se à mistura de forma apropriada.

2.1.4.2. Interpretação dos padrões de Difração de Raios X

Os padrões de difração geralmente são obtidos em instrumentos automatizados similares ao mostrado na Figura 2.1. Nesse caso, a fonte de raios X é um tubo com o filtro apropriado, onde a amostra pulverizada pode substituir o monocristal. Em alguns casos, o porta-amostra é girado para aumentar a aleatoriedade das orientações dos cristalitos.

A identificação de uma espécie a partir de seu difratograma de pó está baseada na posição das linhas (em termos de θ ou 2θ) e suas intensidades relativas. O ângulo de difração 2θ é função do

espaçamento de um conjunto particular de planos; com a ajuda da equação de Bragg, essa distância d é calculada usando o comprimento de onda da fonte e da medida do ângulo. A intensidade das linhas depende do número e do tipo de átomos em cada conjunto de planos.

Figura 2.1. Difração de Raios X por um cristal

A identificação dos cristais é empírica. Um arquivo de dados de difração de pó é mantido pelo *International Centre for Diffraction Data*. Este arquivo foi dividido em subarquivos com listagens separadas para compostos inorgânicos, orgânicos, minerais, metais, ligas, materiais forenses e outros. Os dados são tabelados em termos do espaçamento de d e intensidades relativas das linhas. Normalmente, três ou quatro linhas são suficientes para identificar o composto, sem ambigüidade.

Se a amostra contém dois ou mais componentes cristalinos a identificação torna-se mais complicada. Então, combinações das linhas mais intensas podem ser usadas até que a concordância seja atingida (SKOOG, 2002).

2.1.5. Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho (FTIR)

A região espectral do infravermelho (IV) compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} ou comprimentos de onda de 0,78 a 1000 μm . O espectro infravermelho é convenientemente dividido em radiação no infravermelho próximo, médio e distante; os limites aproximados de cada um estão representados na Tabela 2.2 (SKOOG, 2002).

Os espectros de absorção no infravermelho são geralmente muito complexos e exibem numerosos máximos e mínimos, apropriados para fins de comparação. Sendo assim, a principal aplicação da espectroscopia de absorção no infravermelho é a identificação de compostos orgânicos e na elucidação de estruturas moleculares desconhecidas (OHLWEILER, 1982).

Tabela 2.2: Regiões espectrais no Infravermelho

Região	Intervalo de comprimento de onda (λ) μm	Região de número de onda (ν), cm^{-1}	Região de frequência (ν) Hz
Próximo	0,78 a 2,5	12800 a 4000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio	2,5 a 50	4000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante	50 a 1000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
Mais usada	2,5 a 15	4000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

O espectro de absorção no IV de um padrão de colesterol, ilustrado na Figura 2.2, é uma reprodução de saída final obtida em um espectrofotômetro amplamente utilizado. A ordenada é linear em transmitância, como geralmente ocorre, e a abscissa é linear em número de onda, com unidades de centímetros recíprocos. A maioria dos instrumentos modernos usa um microcomputador dedicado com programa versátil, capaz de produzir uma variedade de registros, como transmitância *versus* comprimento de onda e absorbância *versus* número de onda ou comprimento de onda.

Figura 2.2 – Espectro de absorção na região do infravermelho de uma amostra de padrão de colesterol.

A radiação infravermelha não é energética o suficiente para causar as transições eletrônicas encontradas nas radiações; ultravioleta, visível e raios X. A absorção está muito restrita a espécies moleculares que tem diferenças de energia pequenas entre vários estados vibracionais e rotacionais. Portanto, para absorver radiação infravermelha, uma molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. Apenas nestas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos.

Para uma molécula diatômica ou triatômica simples, é fácil definir o número e a natureza de suas vibrações e relacioná-las as energias de absorção. Este tipo de análise fica muito difícil para moléculas constituídas de muitos átomos. As moléculas grandes apresentam muitos centros de vibração e também podem ocorrer interações entre esses centros que precisam ser levadas em conta.

As vibrações apresentam categorias de *estiramento* (ν) e *deformações* (δ) *angulares*. Uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação

entre dois átomos. As vibrações de deformação angular são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações e são de quatro tipos: tesoura (*scissoring*), balanço (*rocking*), sacudida (*wagging*) e torção (*twisting*), Figura 2.3.

Os tipos de vibração mostrados na Figura 2.3 podem ser possíveis em moléculas com mais de dois átomos. Além disso, interação ou *acoplamento* de vibrações podem ocorrer se envolverem um mesmo átomo central (SCHADER, 1995).

Figura 2.3. Tipos de Vibrações Moleculares. Onde (+) indica movimento para fora da página e (-) indica movimento para dentro da página.

Considerando inicialmente vibrações isoladas representadas por um modelo mecânico simples, chamado de *oscilador harmônico*, pode-se aproximar as vibrações de estiramento a este modelo, composto por duas massas unidas por uma mola. Uma perturbação de uma das

massas ao longo do eixo da mola resulta em uma vibração denominada *movimento harmônico simples*.

Se a vibração de uma única massa ligada a uma mola que está pendurada em um objeto imóvel for deslocada de uma distância y da sua posição de equilíbrio pela aplicação de uma força na direção do eixo da mola (Figura 2.4.a), a força de restauração F é proporcional ao deslocamento (lei de Hooke), conforme a equação 1.

$$F = -ky \quad (1)$$

Onde k é a *constante de força* que depende da rigidez da mola. O sinal negativo indica que F é uma força de restauração. Isto significa que a direção da força é oposta a direção do deslocamento. Assim, a força tende a restaurar a massa a sua posição original (SKOOG, 2002).

A energia potencial de um oscilador harmônico muda periodicamente à medida que a distância entre as massas varia (Figura 2.4.a). A partir de considerações qualitativas, no entanto, essa descrição parece imperfeita. Por exemplo, à medida que dois átomos se aproximam a repulsão coulombiana entre os dois núcleos produz uma força que age na mesma direção da força de restauração da ligação; assim, espera-se que a energia potencial cresça mais rapidamente do que o modelo do oscilador harmônico prevê. Qualitativamente, as curvas têm que tomar a forma anarmônica, mostrada na Figura 2.4.b.

O comportamento anarmônico conduz a desvios de duas espécies. Em números quânticos altos, ΔE se torna menor (curva 2 da Figura 2.4.b), e a regra de seleção não é seguida rigorosamente. Como resultado, transições de $\Delta v = \pm 2$ ou ± 3 são observadas. Tais transições são responsáveis pelo aparecimento de linhas harmônicas (não fundamentais); a intensidade de absorção dessas linhas é pequena e os picos podem não ser observados.

Figura 2.4. Diagrama de Energia Potencial.

Curva a: Oscilador Harmônico; Curva b: Oscilador Anarmônico.

Quatro fatores levam a produção experimental de um número menor de picos que o esperado pelos modos normais. Isso ocorre quando:

- a simetria da molécula é tal que não ocorre variação no dipolo a partir de uma vibração particular;
- as energias de duas ou mais vibrações são idênticas ou muito próximas;
- a intensidade de absorção é tão baixa que não é detectada pelos meios comuns;
- a energia vibracional está em uma região de comprimento de onda além da faixa do instrumento (SKOOG, 2002).

2.2. Técnicas Analíticas Utilizadas na Caracterização Térmica

2.2.1. Introdução à Análise Térmica

Análise térmica é definida como sendo um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada [IONASHIRO, 1980; WENDLANDT, 1986; HAINES, 1995]. Esta definição implica que três critérios devem ser satisfeitos para que uma técnica térmica seja considerada termoanalítica:

- a) uma propriedade física deve ser medida;
- b) a medida deve ser expressa direta ou indiretamente em função da temperatura;
- c) a medida deve ser executada sob um programa controlado de temperatura.

2.2.2. Termogravimetria(TG)/TermogravimetriaDerivada (DTG)

2.2.2.1. Termogravimetria (TG)

A termogravimetria (TG) é uma técnica da análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química definida e constante, determinar a temperatura em que começam a se decompor e acompanhar o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre outras aplicações. Três modos de TG são comumente usados, como ilustrado na Figura 2.5: a) TG *isotérmica*, em

que a massa da amostra é registrada em função do tempo à temperatura constante, a Figura 2.5.a ilustra um aquecimento rápido até a temperatura T_n que é mantida constante por um certo tempo; b) TG *quasi-isotérmica*, em que a amostra é aquecida a uma razão linear enquanto não ocorre variação de massa. A partir do momento em que a balança detecta a variação de massa a temperatura é mantida constante até se obter um novo patamar, característico de massa constante, e assim sucessivamente (Figura 2.5.b); c) TG *dinâmica ou convencional* (Figura 2.5.c), em que a temperatura da amostra varia de maneira pré-determinada, preferencialmente, a uma razão de aquecimento ou resfriamento linear [WENDLANDT, 1986].

Os experimentos de avaliação das variações de massa de um dado material em função da temperatura são executados mediante uma termobalança (associação forno-balança), que deve permitir o trabalho sob as mais variadas condições experimentais, tais como: diferentes atmosferas gasosas e massas de amostras, variáveis razões de aquecimento e/ou condições isotérmicas, etc. As curvas geradas fornecem informações sobre a estabilidade térmica da amostra, sua composição e a estabilidade dos compostos intermediários e do produto final. Obviamente que, durante os processos térmicos, a amostra deve liberar um produto volátil devido a processos físicos ou químicos, tais como: desidratação, vaporização, dessorção, oxidação, redução, etc.; ou deve interagir com o gás da atmosfera atuante no interior do forno resultando em processos que envolvem ganho de massa, tais como: adsorção, oxidação de ligas ou metais, óxidos e óleos, etc. As variações de massa podem ser determinadas quantitativamente, enquanto outras informações obtidas a partir de uma curva TG são de natureza empírica, visto que as temperaturas dos eventos térmicos são dependentes de parâmetros relacionados a características da amostra e/ou fatores instrumentais (Matos & Machado, 2004).

No método termogravimétrico convencional ou dinâmico, são registradas curvas de massa da amostra (**m**), em função da temperatura (**T**), ou do tempo (**t**), conforme a equação 2:

$$m = f(T \text{ ou } t) \quad (2)$$

Figura 2.5. Demonstração dos perfis das curvas TG: a) TG isotérmica; b) TG quase-isotérmica; c) TG dinâmica ou convencional.

2.2.2.2. Termogravimetria derivada (DTG)

Na termogravimetria derivada (DTG), as curvas são registradas a partir das curvas TG e correspondem à derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) que é registrada em função da temperatura ou do tempo, isto é, conforme a equação 3:

$$dm/dt = f(T \text{ ou } t) \quad (3)$$

ou ainda, à derivada primeira da variação de massa em relação à temperatura (dm/dT) que é registrada em função da temperatura ou do tempo, isto é, conforme a equação 4:

$$dm/dT = f(T \text{ ou } t) \quad (4)$$

Essa curva pode ser obtida por métodos de diferenciação manual dos dados da curva TG ou por diferenciação eletrônica do sinal de TG. Deve ser compreendido que uma curva DTG não contém mais informações do que uma curva TG integral, obtida sob as mesmas condições experimentais. Ela, simplesmente, apresenta os dados de forma diferente. As informações obtidas a partir da curva DTG podem assim ser resumidas:

- a) A curva DTG apresenta as informações de uma forma mais facilmente visualizáveis.
- b) A curva DTG permite a pronta determinação da temperatura em que a taxa de variação de massa é máxima, T_{pico} , que fornece informações adicionais sobre T_{onset} e T_{endset} . No entanto, todas as três temperaturas respondem a variações nas condições experimentais, e os valores de T_{pico} não são mais característicos de um material do que aqueles de T_i e T_f (MATOS & MACHADO, 2004).
- c) A área do pico sob a curva DTG é diretamente proporcional à variação de massa.
- d) A altura do pico da curva DTG a qualquer temperatura fornece a razão de variação de massa naquela temperatura. Esses valores podem ser usados para obter informações cinéticas, visto que as equações podem ser escritas conforme a equação 5 [WENDLANDT, 1986]:

$$-\frac{dm}{dt} = A e^{(-E/RT)} f(m) \quad (5)$$

onde : A é o fator pré-exponencial, E é a energia de ativação, R é a constante da lei dos gases.

2.2.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O termo *calorimetria exploratória diferencial* tem sido motivo de confusão em análise térmica, devido aos diferentes tipos de equipamentos que usam o mesmo nome. Estes instrumentos são baseados em configurações, que podem ser divididas em dois grandes

grupos: *DSC de fluxo de calor* e *DSC de compensação de potência*. Os limites de temperatura podem variar de um fabricante para outro, mas geralmente se encontram na faixa de -180°C a 725°C .

2.2.3.1. DSC de fluxo de calor

É uma técnica derivada da análise térmica diferencial (DTA). A propriedade física medida também é a diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência, enquanto ambas são submetidas a uma programação rigorosamente controlada de temperatura. Neste tipo de DSC, amostra e referência são colocadas em cápsulas idênticas, posicionadas sobre um disco termoelétrico e aquecidas por uma única fonte de calor. O calor é transferido para as cápsulas de amostra e referência por meio do disco, com o fluxo de calor diferencial entre ambas as cápsulas sendo controlado por meio de termopares conectados ao disco.

2.2.3.2. DSC de compensação de potência

O DSC de compensação de potência é um calorímetro que mede diretamente a energia envolvida nos eventos térmicos. A amostra e a referência são aquecidas ou resfriadas em fornos separados idênticos. O princípio de funcionamento do equipamento é que amostra e referência sejam mantidas sempre em condições isotérmicas. Assim, se a amostra sofre alteração de temperatura promovida por um evento endotérmico ou exotérmico, os termopares detectam a diferença de temperatura entre ela e a referência, e o equipamento, automaticamente, modificam a potência de entrada de um dos fornos (da amostra ou da referência), de modo a igualar prontamente a temperatura de ambos. A diferença de calor (dH/dt) fornecido à amostra ou à referência é registrada em função da temperatura (T) ou do tempo (t) [MCNAUGHTON & MORTIMER, s/d].

2.2.3.3. As curvas DTA/DSC

Antes de iniciar um experimento por DSC, deve-se conhecer a linha base das curvas geradas pelo equipamento, que é obtida executando-se um ensaio com duas cápsulas vazias ou deixando-se a célula DSC sem as cápsulas de A (amostra) e R (referência). As condições experimentais (programação de temperatura, atmosfera do forno e fluxo de gás) empregadas na obtenção da linha base devem ser as mesmas dos experimentos com as amostras. Alterações da posição da linha base podem ser decorrentes de variações de calor específico da amostra, perda de massa da amostra ou alteração da programação de temperatura durante o experimento.

Os eventos térmicos que geram modificações em curvas DSC podem ser basicamente, transições de primeira e segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variação de entalpia - endotérmica ou exotérmica - e dão origem à formação de picos. Como exemplo de eventos endotérmicos que podem ocorrer em amostras de cálculos biliares com presença significativa de colesterol pode-se citar: fusão, perda de massa da amostra (vaporização de água, produtos voláteis de reação ou decomposição). Eventos exotérmicos observados nessas mesmas amostras podem ser: cristalização, oxidação, degradação oxidativa, adsorção e outros. As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica, porém sem variações de entalpia. Assim, estas transições não geram picos nas curvas DTA/DSC, apresentando-se como um deslocamento da linha base em forma de S. Um exemplo característico é a transição vítrea, muito comum em polímeros (MATOS & MACHADO, 2004).

2.3. Considerações Gerais sobre Colelitíase

A enfermidade conhecida como colelitíase ou litíase biliar, caracterizada pela presença de cálculos ou concreções na vesícula biliar ou nos ductos biliares (STEDMAN, 1996), é considerada freqüente na população mundial e por este motivo, a comunidade científica, vêm se dedicando continuamente para o esclarecimento dessa incidência.

Nos EUA, anualmente, são praticadas cerca de um milhão de colecistectomias (cirurgias para retiradas dos cálculos ou dos cálculos e da vesícula biliar, STEDMAN, 1996) dando indícios da alta prevalência dessa afecção neste país. No Brasil, Rocha realizou no Triângulo Mineiro o primeiro trabalho sobre a incidência de colelitíase (ROCHA, 1977) e Nakaie estudou tal incidência no município de São Paulo, utilizando amostras de um total de 984 necrópsias realizadas no serviço de verificação de óbitos, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Concluiu que a ocorrência dessa anomalia, no universo estudado, é uma das maiores do mundo (NAKAIE, 1980).

A problemática que caracteriza a formação dos cálculos biliares tem sido constantemente estudada. Entretanto Bennett e colaboradores foram incapazes de estabelecer uma correlação positiva entre doenças do cálculo biliar e outros fatores tais como: obesidade, diabetes, níveis de colesterol no soro, arteriosclerose e paridade. Todavia acredita-se que sendo mulheres ou obesas aumentaria a chance do desenvolvimento dos cálculos biliares (BOKUS, 1985).

GRANADOS & colaboradores, em 1994, indicam a possível correlação de hormônios estrógenos (femininos) que, em excesso na gravidez, nas terapias de reposição hormonal e nas pílulas anticoncepcionais aparentemente, aumentariam os níveis de colesterol na bÍlis, diminuindo a motilidade dentro da vesícula biliar, podendo ocasionar a formação de cálculos. Ainda, drogas que reduzem o nível de colesterol no sangue podem incrementar a quantidade de colesterol

segregado na bÍlis; os diabéticos que geralmente tem altos níveis de triglicerÍdeos, também têm o risco de apresentar cálculos mais facilmente, além das pessoas acima de 60 anos, que podem ter maior possibilidade de desenvolver cálculos que os mais jovens (GRANADOS & CÁRDENAS,1994). Alguns fatores étnicos também podem ser causadores desta enfermidade, pois os americanos nativos têm uma predisposição genética a segregar altos níveis de colesterol na bÍlis (SAMPLINER, *et alii*). Homens e mulheres mexicanos e bolivianos nativos também apresentam altas taxas de desenvolvimento de cálculos biliares (GRANADOS & CÁRDENAS,1994).

Segundo um estudo estatístico, realizado na escola de Saúde Pública de Harvard, 60290 mulheres de todo território dos Estados Unidos, entre 40 e 65 anos, que não apresentavam cálculos no início da pesquisa, em 1968, eram examinadas a cada dois anos e questionadas sobre suas atividades físicas diárias. Ao longo de 25 anos de pesquisa, demonstrou-se que as mulheres que faziam ao menos 30 minutos de atividades físicas diárias reduziram em 31% a possibilidade de serem submetidas à cirurgia biliar (LEITZMAN, 1999).

A litÍase biliar se apresenta em três estÁgios clÍnicos:

- Assintomático: também conhecido como cálculo silencioso, que a princípio não interferem na função da vesÍcula biliar, fÍgado e pÍncreas;
- Sintomático: quando apresenta sintomas similares a apendicite, úlcera, irritação intestinal, geralmente acompanhado de fortes cólicas;
- Complicado: este último incluindo tanto a colelitÍase aguda como a coledocolelitÍase (cálculos localizados no colédoco).

A intervenção cirúrgica para remoção dos cálculos ou dos cálculos e da vesÍcula biliar, chamada colecistectomia, é a forma mais indicada de tratamento nestes casos (GRANADOS & CÁRDENAS, 1994). Alguns estudos também relacionam o cÁncer vesicular com a colelitÍase (STRASBERG & CLAVIEN, 1993).

Os cálculos localizados na vesÍcula biliar causam poucos sintomas, que surgem somente quando há movimentação dos mesmos

ocasionando obstrução do ducto cístico ou do hepatocolédoco. A cólica biliar é a manifestação sintomática mais comum que caracteriza a colelitíase (RAIA & ZERBINI, 1988).

Vários autores concordam que os casos de colelitíase sintomática devam ser submetidos à cirurgia, ou podem provocar, em 50% destes, obstrução do colédoco e várias complicações decorrentes da doença (RAIA & ZERBINI, 1988).

Em relação à composição química e característica física, Sutor e Wooley, classificaram os cálculos biliares vesiculares humano em três tipos: cálculos de colesterol, e dois tipos de cálculos pigmentares, comumente chamados de preto e marrons (Tabela 2.3) (SUTOR & WOOLEY, 1971). Posteriormente, estudos relataram que, aproximadamente, 75% dos cálculos biliares são constituídos de cristais de colesterol e 25% formados pelo excesso de pigmentos biliares, estes classificados e subdivididos de acordo com sua ocorrência em: 20% de cálculos pigmentares pretos e 5% de cálculos pigmentares marrons (APSTEIN & CAREY, 1993). Vários outros autores concordam com esta classificação, mas acrescentam ainda os cálculos mistos, que associam colesterol aos sais biliares e bilirrubina, mediante utilização de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e/ou FTIR (VITETTA *et alii*, 2000; NAKAI *et alii*, 2003).

Há ainda estudos sobre a relação entre a bile infectada com *E. coli*, onde esta seria crucial para a patogênese de cálculo pigmentar marrom, que consiste, principalmente, de bilirrubinato de cálcio e palmitato de cálcio, estudos utilizando microscopia e FTIR, respectivamente, sendo comumente formados no ducto biliar (VITETTA *et alii*, 2000; XIE *et alii*, 2003).

Existem, ainda, outros tipos de cálculos biliares, constituídos quase que exclusivamente por sais de cálcio, sob a forma de carbonato, fosfato, estearato ou palmitato, por ordem decrescente de frequência. Esses cálculos são considerados muito raros (MARQUES, 1993).

Quanto aos cálculos de colesterol, foi confirmado através de cristalografia, que os maiores componentes são os cristais de colesterol monoidratados e pequena quantidade de uma forma cristalina alternativa de colesterol anidro (SUTOR & WOOLEY, 1971). O conteúdo de cálcio é maior em cálculos com baixo teor de colesterol do que naqueles com mais de 80% em peso de colesterol (WHITING et alii, 1983).

Em 2000, HAI e colaboradores realizaram um trabalho caracterizando as pérolas de cálculos biliares (chamados, assim, devido a sua coloração), utilizando a espectrometria de absorção na região do infravermelho (FTIR), cujas amostras foram preparadas em pastilhas de KBr, e a microscopia eletrônica de varredura (SEM). Com base no universo das amostras estudadas, esses pesquisadores concluíram que os cálculos biliares são compostos principalmente de colesterol, algumas proteínas e sais inorgânicos de cálcio (HAI et alii, 2000). No entanto em 2001, ZENG e colaboradores realizaram um estudo de caracterização dos cálculos biliares humanos, empregando o FTIR como método comparativo, avaliando a presença ou não de colesterol, bilirrubinato de cálcio, carbonato de cálcio, hidroxicarbonato e fosfato nos cálculos e suas misturas (ZENG et al, 2001).

Dollimore, em 1993, abordou o comportamento térmico de cálculos biliares, demonstrando que a TG pode ser usada para determinar várias proporções de colesterol, CaCO_3 e CaC_2O_4 em misturas sintéticas (DOLLIMORE, 1993). Outro trabalho também utiliza a TG e DSC para investigar amostras de cálculos biliares humanos e determinar o teor de colesterol das amostras. Neste trabalho, 80% dos 34 cálculos estudados eram de pacientes do sexo feminino e apenas 20% de homens. Apenas oito destas amostras foram caracterizadas e dentre elas apenas um cálculo era proveniente de um paciente do sexo masculino. Também foram utilizados FTIR e análise elementar (CHN) nestas oito amostras, e todas foram consideradas como cálculos de colesterol, com porcentagem calculada deste último, variando entre 91

e 98%. Alguns metais, como Ca, Na, Mg, e K foram determinados, através de AAS, mas devido ao teor de colesterol, há menos de 1% em massa, de Ca, presente nestas amostras. O teor máximo de resíduos sólidos encontrados nas curvas TG a 550°C é de apenas 5% (TOSCANO *et alii*, 2004).

Tabela 2.3 - Classificação dos cálculos biliares.

TIPO	Colesterol	Preto	Marron
LOCALIZAÇÃO	Vesícula biliar Ductos biliares	Vesícula biliar Ductos biliares	Ductos biliares
MAIORES CONSTITUINTES	Colesterol	Bilirrubina e sais de cálcio	Sais de cálcio
CONSISTÊNCIA	Cristalinos com núcleos	Duros	Macios
% * (RADIAÇÃO-OPACA)	15	60	0
ASSOCIAÇÕES COM INFEÇÕES	Raros	Raros	Usual
OUTRAS DOENÇAS	**	Hemólises; Cirroses	Obstrução biliar parcialmente crônica

**Radiação-opaca significa dizer que podem ser observados por raios X*

***Devem-se considerar fatores relacionados a nucleação do colesterol, supersaturação da bile, função da vesícula biliar e circulação de sais biliares êntero-hepática.
(SUTOR & WOOLEY, 1971; SHEILA, 1975).*

Em 2000, Mercuri desenvolveu uma tese de doutorado na qual caracterizou e avaliou sob o aspecto químico e termoanalítico um universo de 40 amostras de cálculos biliares e bile vesicular humana de pacientes, de ambos os sexos, que foram submetidos à colecistectomia no HU-USP no estado de São Paulo. Esse trabalho aplicou de maneira direta a interdisciplinaridade entre as áreas química e médica. Com a comparação dos resultados obtidos dos perfis das curvas TG/DTG, dos resultados de perdas de massa e dos teores de CHN obtidos por análise elementar, foi possível classificar os cálculos biliares em oito grupos

distintos (A, B, C, D, E, F, G e H). As curvas DSC, os espectros de infravermelho e os difratogramas de raios X confirmaram a distinção da composição química desses grupos. Deste modo, foi possível propor uma nova classificação para os cálculos biliares da vesícula biliar humana baseado na sua composição química. Neste trabalho ainda, é sugerido outros estudos comparativos, como os cálculos masculinos, cálculos de animais e determinação de traços de metais pesados e correlacioná-los aos aspectos clínicos para elucidar os mecanismos de formação dos cálculos biliares (MERCURI, 2000).

ERPECUM, em 2004, descreveu em seu trabalho realizado no Hospital Universitário de Utrecht, sobre a importância desta afecção que atinge cerca de 10% da população do mundo ocidental. A maioria dos pacientes afetados possui cálculos de colesterol. A solubilidade do colesterol é extremamente limitada e há um significativo aumento na solubilidade deste, quando incorporado às micelas de colesterol, sais biliares e fosfolípidos (especialmente a fosfatidilcolina). A supersaturação ocorre quando uma grande quantidade de colesterol ou uma quantidade insuficiente de sais biliares são agregadas à fosfatidilcolina e permitem completar a solubilização do colesterol. Somente em casos onde a quantidade de fosfolípidos é relativamente baixa, ocorre a cristalização do colesterol e a supersaturação da bile, sendo este o início da formação de cálculos biliares. Conforme a Figura 2.1, nos casos envolvendo altas concentrações de fosfolípidos, todo excesso de colesterol é solubilizado em “vesículas” (encapsulados) e não há mais formação de cristais de colesterol. Em casos envolvendo quantidade mais baixa de fosfolípidos, a capacidade de solubilização através das “vesículas” é menor e observa-se a nucleação de alguns cristais de colesterol. Na presença de excesso de sais biliares a cristalização do colesterol é rápida e extensiva.

Figura 2.6 – Quantidades relativas de sais biliares *versus* quantidades de fosfolipídeos são essenciais à cristalização do colesterol através de bile supersaturada.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

*O homem deve ter uma só
Especialidade: deve ser um homem,
Um homem verdadeiro!*

Anton Makarenko

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Matérias Primas

Para iniciar as coletas dos produtos acabados, objetos de estudo deste trabalho, realizou-se um projeto de pesquisa que foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP).

Mediante a aprovação do projeto pelo CEP, foram coletadas um total de 25 amostras, sendo 15 de cálculos biliares e 10 de bile vesicular de pacientes do sexo masculino submetidos à colecistectomia no HU-USP.

As amostras coletadas receberam um código de identificação relativo ao tipo de material coletado, preservando, assim, a identidade dos pacientes, e um número por ordem de realização da intervenção cirúrgica, como mostra a Figura 3.1.

Figura 3.1. Codificação das amostras de cálculo biliar (C) e bile vesicular (B) e seus respectivos números de coleta.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Metodologia de Amostragem

As amostras de cálculos biliares e biles foram coletadas pela equipe cirúrgica do HU – USP, imediatamente após o processo cirúrgico no período entre Fevereiro/2003 a Dezembro/2004. Os cálculos biliares foram acondicionados em frascos de vidro transparente com tampa, previamente descontaminados com água destilada e fervida a 100°C e secos em estufa por aproximadamente 24h a 200°C, enquanto as biles foram coletadas em tubos de ensaio esterilizados através de autoclave, fornecidos pelo HU (MERCURI, 2000). A Figura 3.1 representa o fluxograma de coleta e armazenamento das amostras.

Inicialmente, as amostras coletadas foram acondicionadas em recipiente com gelo seco, e posteriormente conseguiu-se que as mesmas fossem armazenadas no congelador do centro cirúrgico, até que fossem transportadas para o LATIG, aonde permaneceram em freezer ($\sim -27^{\circ}\text{C}$) até o momento de serem tratadas, para então submetê-las às análises.

3.2.2. Metodologia de pré-tratamento das amostras

As amostras de cálculos biliares foram descongeladas e seqüencialmente colocadas em dessecador contendo silica-gel, sob pressão reduzida, por três dias, para procedimento de secagem. Em seguida, cada amostra foi dividida, preservando uma parte desse material para estudos futuros e a outra submetida a pulverização em almofariz de ágata.

As amostras de bile foram submetidas ao processo de liofilização, com o objetivo de eliminar toda água e conservar a integridade desses materiais. Esses ensaios foram realizados no laboratório de Pesquisa da Oxiten S.A., utilizando um liofilizador “Vapor Trap”, modelo RVT 4104,

marca Thermo Savant, em condições *over-nigth*, Após este processo, foram armazenadas em dessecador com sílica-gel, permanecendo assim até o momento das medidas.

3.3. Métodos de Análise

3.3.1. Caracterização Química

3.3.1.1. Análise Elementar

A determinação quantitativa de C, H e N presentes nas amostras, foram realizadas no Laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), utilizando o equipamento ELEMENTAL ANALYZER CHN, modelo 2400 da Perkin Elmer, onde as amostras foram colocadas em capsulas de estanho, com massa em torno de 1 a 2 mg e calcinadas a 925°C, em volume conhecido de oxigênio isento de impurezas orgânicas a pressão constante.

3.3.1.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos utilizando o espectrofotômetro da marca Nicolet, modelo Magna IR 550 série II, da Oxiten S.A. Industria e Comercio, registrados na região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando a metodologia da pastilha, obtida com aproximadamente 1% da amostra diluída em KBr (Merck) com 99% de pureza.

3.3.1.3. Difractometria de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram obtidos através do método do pó, utilizando um difratômetro do tipo *Bragg-Brentano*, marca Siemens, modelo D5000, do laboratório de Difração de Raios X do Instituto de Geociências da USP – São Paulo. A interpretação foi realizada utilizando o banco de dados “Data Sets 1-51 plus 70-89 Powder Diffraction File – International Centre for Diffraction, Pensylvania – USA”. Massas de amostras de 1 a 2 mg foram suportadas em lâminulas de vidro fosco, submetidas a 40 kV e 40 mA, fornecendo radiação CuK α e $\lambda=1,542 \text{ \AA}$, com exposição de 3 a 65 (2θ).

3.3.1.4. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

As determinações de Pb, Cu e Cd foram realizadas no laboratório LEEAA (Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica), utilizando um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica da ANALITYKJENA AG (AAS ZEEnnit 60) com lâmpada de cátodo oco, tubo de grafite com aquecimento transversal e corretor de radiação de fundo baseado no efeito *Zeeman* variável. Os parâmetros utilizados no estudo da temperatura de pirólise e atomização para Pb, Cu e Cd, estão descritos na Tabela 3.2, assim como os modificadores químicos utilizados para Pb e Cd.

Tabela 3.2. Parâmetros utilizados no equipamento AAS.

Elemento	λ (nm)	I (mA)	Fenda (nm)	Modificador Químico
Pb	217,0	4,0	0,8	25 μ g NH ₄ H ₂ PO ₄
Cd	228,8	4,0	0,8	5 μ g Pd + 3 μ g Mg
Cu	324,8	4,0	0,8	—

3.3.1.4.1. Digestão Total das amostras

Para a determinação de metais nas amostras de cálculos biliares, utilizou-se como procedimento de preparo das amostras, a digestão ácida das amostras em microfrascos de polietileno adaptados a um forno de microondas focalizadas, utilizando-se 200 μ L de HNO₃ concentrado (70%) e 100 μ L de H₂O₂ a 30%. O programa de aquecimento está listado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Programa de aquecimento do forno de MO – 300W de potência para digestão total dos cálculos biliares.

Etapa	Reagentes	Potência (%)	tempo (min)
1	HNO ₃ (70%) 200 μ L	10	1
2	—	0	1
3	—	10	1
5	—	0	1
6	—	10	1
7	—	0	1
8	—	10	1
9	H ₂ O ₂ (30%) 100 μ L	—	—

3.3.1.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹H) e de carbono-13 (RMN ¹³C) foram obtidos no Laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), registrados com instrumentos da massa Bruker, modelos AC-200 e DRX-300 ou Varian, modelo T-60. Para solubilizar as amostras submetidas a essa análise, o solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (Aldrich).

3.3.2. Estudo Termoanalítico

3.3.2.1. Termogravimetria(TG)/TermogravimetriaDerivada (DTG)

Os estudos termogravimétricos foram realizados com o intuito de verificar a estabilidade e a decomposição térmica dos cálculos biliares e da bile. Para tanto, utilizou-se uma Termobalança modelo TGA-50, marca *SHIMADZU*, com capacidade máxima de 200 mg e detecção de variação de massa de $\pm 1\mu\text{g}$. As curvas TG/DTG foram obtidas em atmosfera dinâmica de ar, com vazão de 50 mL min^{-1} , em intervalo de temperatura, da ambiente até 900°C , com razão de aquecimento (β) de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As massa das amostras foram em torno de 3 a 4 mg, suportadas em cadinho de platina. O tratamento de dados realizado utilizando o programa TA-60 WS. Foram obtidas as curvas TG utilizando cadinho de platina vazio, chamadas de branco. Para a verificação da relação sinal/ruído e a correção da linha de base da instrumentação.

As condições da instrumentação foram verificadas através da obtenção de curvas TG/DTG para um padrão de $\text{CaC}_2\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, Figura 3.2 (SHIMADZU, 1989; 1995). A comparação entre os valores, indicados na figura, de variação de massa experimentais e esperados, conforme estequiometria da reação de decomposição térmica do $\text{CaC}_2\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, confirma que a instrumentação está adequada para uso.

Figura 3.2. Curvas TG/DTG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de ar para uma amostra padrão de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
(Os valores em negrito são as porcentagens calculadas e os outros valores são experimentais).

3.3.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Assim como as técnicas Termogravimetria (TG) / Termogravimetria derivada (DTG), o DSC também foi empregado para avaliar a estabilidade e a decomposição térmica das amostras de cálculos biliares e bile, mas também para verificar os eventos de origem física que não estão associados à perda de massa. As curvas foram obtidas em célula DSC-50, da marca *SHIMADZU*, em atmosfera dinâmica de N_2 com vazão de 100 mLmin^{-1} , intervalo da temperatura ambiente até 550°C e razão de aquecimento (β) de $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$. As massas de amostras entre 1,5 e 2 mg, foram colocadas em cápsulas de alumínio parcialmente fechadas. Alguns ensaios foram realizados apenas com as amostras C01, C02, C08, C09 C11 e C14, para melhor identificação do evento relativo ao pico de fusão do colesterol dessas amostras, em intervalo que vai da temperatura

ambiente até 180°C e com razão de aquecimento (β) de 5°Cmin⁻¹, os outros fatores foram mantidos constantes. O tratamento de dados foi feito com o programa TA-60 WS.

O equipamento foi calibrado anteriormente às medidas utilizando índio e zinco metálicos de purezas 99.99%, com ponto de fusão e entalpia de fusão conhecidos (Figura 3.3). Foram realizadas as devidas correções de acordo com a especificação do fabricante. (SHIMADZU, 1989).

Figura 3.3. Curvas DSC e T de aquecimento e resfriamento obtidas a 10°C min⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de N₂ de uma amostra padrão de Índio metálico.

A aproximação entre os valores medidos e esperados confirma que a célula DSC está devidamente calibrada.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

*Há um universo de respostas à nossa volta
E me anima a possibilidade da surpresa!*

Dr. Emílio Ribas

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Aspectos Gerais sobre as amostras de cálculos biliares e bile

Este estudo considera apenas os cálculos biliares e bile de pacientes do sexo masculino, e ainda assim, há uma imensa variação de aspectos como cor, tamanho, quantidade, volume, massa e textura das amostras.

Dentre os cálculos biliares coletados, o tamanho varia consideravelmente, de minúsculas partículas (menor que 1 mm) a partículas com até 25 mm de diâmetro. A coloração também é muito diversificada, variando, de ocre amarelado, ocre mais escuro, várias tonalidades de marrom e até preto, sendo que muitos deles são heterogêneos em relação à distribuição de cor (Figura 4.1). A quantidade de amostra coletada é diferente em cada caso, ou seja, cada paciente apresenta, diversificadamente, uma quantidade em número de cálculos e em tamanho dos mesmos. Com isso, certo paciente pode apresentar um único cálculo podendo ser grande ou pequeno como também pode apresentar inúmeros cálculos, em geral de tamanho pequeno ou médio (Figura 4.1). Com a bile aconteceu a mesma variabilidade. Em relação ao volume, as biles coletadas apresentaram de 0,5 a 12mL, com viscosidades aparentemente

Figura 4.1. Fotos dos cálculos C10 e C14 respectivamente. Amostras que apresentam heterogeneidade tanto na distribuição de cores quanto no tamanho de cálculos.

diversas e coloração entre tons de verde, amarelo, marrom e até vermelho (podendo esta ter sido contaminada com o sangue do paciente) . A idade dos pacientes variou entre 27 a 80 anos, sendo que predominam pacientes acima de 50 anos.

A coleta de cálculos biliares e bile vesicular humana permitiu a constatação da enorme incidência desta enfermidade em São Paulo, mais especificamente no HU-USP. Durante as semanas que foram objetos de estudo e coleta desse material, o acesso às intenções cirúrgicas do hospital, curiosamente possibilitou a verificação de que o maior número de cirurgias realizadas foi a colecistectomia, numa média de cinco intervenções cirúrgicas por semana, sendo que quase todas de pacientes do sexo feminino. Esta confirmação só motiva ainda mais o estudo desta afecção e confirma a conclusão realizada por Rocha e Nakaie que relata à ocorrência dessa anomalia, como uma das maiores do mundo (ROCHA, 1977; NAKAIE, 1980).

4.2. Caracterização Físico-Química

4.2.1. Análise Elementar (AE)

Os teores CHN obtidos por análise elementar dos cálculos biliares analisados estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Resultados de análise elementar (CHN) das amostras de cálculos biliares.

Amostras	%C	%H	%N
C01	80,35	11,96	0,85
C02	82,11	12,23	0,87
C03	67,25	9,36	4,10
C04	56,79	6,60	7,40
C05	55,76	6,55	7,62
C06	50,39	5,58	5,42
C07	66,69	8,61	5,22
C08	82,43	12,10	0,86
C09	82,28	12,12	0,79
C10	59,98	8,51	3,39
C11	82,05	11,04	0,29
C12	64,06	7,56	5,42
C13	39,20	3,96	4,53
C14	82,71	10,50	0,29
C15	49,60	5,78	6,38

Comparando-se estes resultados com os padrões dos compostos que fazem parte dos processos metabólicos e com os dados encontrados na literatura para pacientes masculinos (MERCURI, 2000) (Tabela 4.2), pode-se observar que em 6 deles (denominados de C01,

C02, C08, C09, C11 e C14) os teores de C e H são compatíveis com aqueles do padrão de colesterol (Tabela 4.3), classificados como grupo A por MERCURI em 2000. Algumas dúvidas surgiram na análise das amostras C01 e C02, pois nas curvas TG/DTG, verificou-se uma etapa intermediária de perda de massa, logo no início da decomposição (Tabela 4.4), não encontrada nos outros cálculos deste mesmo grupo. Posteriormente foram feitas análises de RMN ^{13}C e RMN ^1H , para esclarecimento desta dúvida.

As amostras de cálculos C03 e C07 apresentam também indícios da presença de colesterol, embora com teores de C e H abaixo da prevista pelo padrão e não condizente com cálculos classificados como do grupo A ou B (que também apresenta colesterol em sua composição). O grupo a que mais se aproximam os resultados destas amostras é o grupo C, porém o mais indicado seria a sugestão da existência de um grupo intermediário entre C e D.

Os cálculos chamados de C04 e C05 puderam ser classificados como pertencentes ao grupo F, com teor de C em torno de 56% e colesterol ausente, o que sugere a presença de material inorgânico nesses cálculos. Apenas a análise elementar não foi decisória para classificar esses materiais, porém observando os perfis das curvas TG/DTG pode-se ampliar a possibilidade de classificação, visto que durante o processo de decomposição térmica, sob atmosfera de ar a 900°C, são isolados teores de produtos sólidos da ordem de 10% (Tabela 4.4). Por outro lado, os espectros de absorção na região do infravermelho e os difratogramas de raios X confirmam que ambas são similares e passíveis de pertencerem ao grupo F.

As outras amostras analisadas não apresentam características que se encaixem adequadamente em nenhum dos grupos anteriormente sugeridos, mesmo comparando as curvas TG/DTG, os espectros de absorção no IV, os difratogramas de raios X e os teores de C, H e N. Para estas amostras realizar-se-á uma discussão individual de resultados.

Tabela 4.2. Comparação dos teores de CHN, determinados nos cálculos biliares pertencentes a este trabalho com aqueles encontrados por Mercuri em 2000.

Mercuri,2000					Trabalho Atual				
Grupos	Amostra	%C	%H	%N	Grupos	Amostra	%C	%H	%N
A	SM10	81,36	11,28	0,59	A	C01	80,35	11,96	0,85
	SM13	81,60	11,13	0,58		C02	82,11	12,23	0,87
	SM18	81,61	11,34	0,33		C08	82,43	12,10	0,86
						C09	82,28	12,12	0,79
				C11		82,05	11,04	0,29	
				C14		82,71	10,50	0,29	
B	SM22	76,28	10,45	0,42					
	SM51	76,69	10,81	1,28					
C	SM58	74,99	10,53	2,49	C/D (?)	C03	67,25	9,36	4,10
D	SM31	53,62	6,92	6,43		C07	66,69	8,61	5,22
	SM56	53,93	6,42	6,66					
F	SM43	57,65	6,71	5,77	F	C04	56,79	6,60	7,40
						C05	55,76	6,55	7,62
G	SM44	42,10	5,97	0,36					
					?	C06	50,39	5,58	5,42
						C10	59,98	8,51	3,39
						C13	39,20	3,96	4,53
						C12	64,06	7,56	5,42
						C15	49,60	5,78	6,38

Tabela 4.3. Teores de CHN, teórico e experimental, dos padrões das substâncias que fazem parte do processo metabólico biliar.

Padrões	Fórmula Molecular	%C		%H		%N	
		Teor	Exp.	Teor	Exp.	Teor	Exp.
Colesterol	$C_{27}H_{46}O$	83,87	83,89	11,99	11,78	-	0,27
Bilirrubina	$C_{33}H_{36}N_4O_6$	67,79	66,79	6,21	5,78	9,58	9,17
Bilirrubinato de Cálcio	$C_{33}H_{34}CaN_4O_6$	63,65	56,87	5,50	5,10	9,00	7,87
Colato de Cálcio	$C_{24}H_{39}NaO_5$	66,95		9,13		-	
Deoxicolato de Cálcio	$C_{24}H_{39}NaO_5$	69,53	55,79	9,48	9,19	-	0,20
Ácido Cólico	$C_{24}H_{40}O_5$	70,55	70,34	9,87	9,58	-	0,04
Ácido Quenodeoxicólico	$C_{24}H_{40}O_4$	73,43	72,14	10,27	9,90	-	0,13
Ácido Deoxicólico	$C_{24}H_{40}O_4$	73,43	73,28	10,27	10,06	-	0,12
Ácido Litocólico	$C_{24}H_{40}O_3$	76,55	76,84	10,71	10,70	-	0,04
Éster metílico de ácido cólico	$C_{24}H_{42}O_5$	71,05	70,77	10,02	9,83	-	0,17

Tabela 4.4. Resultados das etapas de perda de massa por TG/DTG para os cálculos biliares.

AMOSTRA	T _{ONSET} (°C)	Δm_1	Δm_2	Δm_3	Δm_4	Δm_5	Δm_6	Resíduo(%) (900°C)	GRUPO PROVÁVEL
C01	292	<u>80,03</u>	<u>4,81</u>	<u>12,92</u>	-----	-----	-----	1,64	A
C02	295	<u>82,48</u>	<u>3,14</u>	<u>13,13</u>	-----	-----	-----	1,26	A
C08	278	84,38	14,78	-----	-----	-----	-----	0,74	A
C09	282	83,46	15,12	-----	-----	-----	-----	1,48	A
C11	293	87,06	12,52	-----	-----	-----	-----	0,22	A
C14	296	88,50	11,01	-----	-----	-----	-----	0,22	A
COLESTEROL	305	84,58	15,41	-----	-----	-----	-----	0,002	PADRÃO
C04	~27	7,64	28,78	50,66	3,62	-----	-----	9,80	F
C05	~27	5,92	27,12	11,38	42,47	3,09	-----	9,26	F
C03	~27	3,60	53,42	13,56	25,19	-----	-----	4,23	C/D
C07	~27	2,14	42,31	19,26	31,47	-----	-----	4,41	C/D
C06	~27	2,10	14,89	14,70	36,40	12,05	-----	20,19	(?)
C10	~27	2,61	34,18	17,60	24,28	2,48	-----	18,70	(?)
C12	~36	1,62	44,86	43,99	3,01	-----	-----	5,97	(?)
C13	~27	3,08	9,26	16,52	28,36	15,13	-----	27,21	(?)
C15	~27	7,07	21,27	12,23	30,36	1,75	4,63	22,13	(?)

4.3. Amostras de cálculos biliares que corroboram com a classificação proposta por Mercuri em 2000.

4.3.1. Grupo A

Foram classificados como pertencentes a este grupo, os cálculos denominados de C01, C02, C08, C09, C11 e C14. As Tabelas 4.1 e 4.4, que indicam, respectivamente, os valores de CHN e as etapas de perda de massa por TG/DTG, se comparadas com aquelas da tese de Mercuri, em 2000, apresentam valores percentuais bastante próximos. O que nos permitiu classificá-las realmente foi o conjunto de resultados encontrados nas diversas técnicas de caracterização utilizadas; como por exemplo, os perfis das curvas TG/DTG e DSC, os espectros no IV e os difratogramas de raios X.

4.3.1.1. Estudo termoanalítico das amostras do grupo A.

As curvas TG/DTG das amostras de cálculos biliares que pertencem ao grupo A, evidenciam que estas são termicamente estáveis até aproximadamente 195°C e possuem duas etapas de perda de massa bem definidas entre 195 °C e 550°C. As amostras C01 e C02 apresentam um evento térmico intermediário – Tabela 4.4, mas ainda assim o valor de perda de massa na mesma faixa de temperatura é correspondente a do colesterol e das outras amostras do mesmo grupo. Foram realizados ensaios de RMN para ratificar a presença do colesterol.

A primeira etapa de decomposição térmica ocorre entre 195°C e 398°C e a variação de massa em média, é de aproximadamente 82%. Essa perda de massa ocorre de forma acentuada e é correspondente à decomposição térmica do colesterol e envolve a quebra de ligações e queima de matéria orgânica com carbonização. Na segunda etapa a perda de massa ocorre de forma mais lenta, até cerca de 650°C e a

variação média que é de aproximadamente 14%, corresponde à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior (Tabela 4.4).

As curvas DSC das amostras de cálculos biliares desse grupo apresentam quatro eventos diferenciados. O primeiro evento é endotérmico e ocorre por volta de 30°C a 55°C, em média, e corresponde a uma transição cristalina do colesterol (LOOMIS et alli, 1979). O segundo evento, bastante característico, ocorre em torno de 131°C a 163°C e está associado ao processo de fusão do colesterol presente na amostra. Ao comparar as curvas DSC com os perfis das curvas TG/DTG das respectivas amostras, pode-se concluir que estes dois primeiros eventos não estão relacionados com nenhuma etapa de perda de massa. O terceiro evento também é endotérmico e ocorre aproximadamente em 215°C; o quarto e último evento, o único exotérmico, em até 500°C. Estes dois eventos finais ocorrem com associação às perdas de massa vista nas curvas TG/DTG e são característicos da decomposição térmica da amostra.

Para ilustrar estas informações, utilizou-se como exemplo a amostra C08 (Figura 4.2) representando o grupo A. As curvas TG/DTG e DSC das outras amostras podem ser encontradas no anexo.

Outro estudo realizado por DSC está relacionado ao evento endotérmico de fusão do colesterol, cuja área interna do evento indica a variação de entalpia (ΔH) a ele associada. Comparando-se o valor de ΔH deste evento do padrão de colesterol com aqueles encontrados para as amostras avaliadas, é possível estimar um teor de colesterol para cada uma delas. Os valores de ΔH encontrados estão listados na Tabela 4.5 e foram obtidos em triplicata, em condições específicas para melhor identificar o evento citado (em $\beta = 5^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica N_2 , e temperatura da ambiente até 180°C). Neste estudo pode-se notar que todas as amostras classificadas como grupo A apresentam acima de 90% de colesterol em sua composição.

Figura 4.2. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C08, representativa do grupo A.

Tabela 4.5. Resultados dos valores médios para temperatura *onset*, temperatura de pico, entalpia de fusão e porcentagem estimada de colesterol nas amostras.

Cálculo	Temp_{onset} (°C)	Temp_{pico} (°C)	ΔH (J/g)	% Colesterol
C01 (Grupo A)	144,9	146,8	71	~95%
C02 (Grupo A)	143,5	146,3	73	~97%
C08 (Grupo A)	143,8	146,6	75	~100%
C09 (Grupo A)	143,1	147,0	75	~100%
C11 (Grupo A)	145,2	147,2	68	~91%
C14 (Grupo A)	143,5	146,7	70	~93%
Colesterol	146,5	148,7	74	-----
C03 (Grupo C ₁)	144,4	146,4	38	~51%
C07 (Grupo C ₁)	134,7	144,1	13	~17%
C06	144,9	146,4	1	~1%
C10	141,9	144,1	1	~1%

Os cálculos C04, C05, C12, C13 e C15 não apresentam colesterol em sua composição.

4.3.1.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras do grupo A.

Nas amostras de cálculos biliares classificados como grupo A, foram encontradas as bandas de absorção no IV condizentes com aquelas encontradas no padrão de colesterol [(1462 e 1440; 1377 e 1365; 1051 cm^{-1}) Tabela 4.6 e Figura 4.3] e também algumas referentes ao bilirrubinato de cálcio (1664 e 1628; 1574 cm^{-1}), ainda que este não esteja em quantidade muito representativa. As amostras deste grupo são constituídas quase totalmente de colesterol e algumas delas não apresentam as bandas características de bilirrubinato de cálcio.

Tabela 4.6. Principais bandas de absorção na região do Infravermelho para o padrão de colesterol.

Composto	Nº de onda (cm^{-1})	Atribuições
Colesterol	3441	ν (OH) alcoólica
	2934	ν (C - H)
	1462 e 1440	δ (CH_2 e CH_3)
	1377 e 1365	δ (CH_3) geminal
	1051	ν (C - OH) posição 3α

Onde: ν = estiramento e δ = deformação

Figura 4.3. Fórmula estrutural do Colesterol.

Figura 4.4. Espectros FTIR das amostras C08 e C09 classificadas como grupo A, que apresentam bandas bem caracterizadas para colesterol e bandas de bilirrubinato de cálcio não tão expressivas na amostra C08.

4.3.1.3. Difração de Raios X (DRX)

Algumas amostras desse grupo apresentaram-se cristalinas a olho nu, enquanto outras não (Figuras 4.5 e 4.6). Porém, em todas classificadas como grupo A, os difratogramas de raios X apresentam formação cristalina bem caracterizada, onde as distâncias interplanares e as intensidades relativas das linhas de difração possibilitaram a identificação de colesterol, conforme a comparação realizada com o banco de dados "Data Sets 1-51 plus 70-89 Powder Diffraction File – International Centre for Diffraction, Pennsylvania – USA". Sua confirmação está no número das fichas encontradas em cada difratograma. O bilirrubinato de cálcio não foi identificado, talvez devido ao seu baixo teor nas amostras ou a heterogeneidade das mesmas, não sendo captado pelo ângulo de incidência dos raios X ou mesmo não estando presente na pequena quantidade de amostra suportada na lâminula de vidro.

Figura 4.5. Fotos dos cálculos C01 e C11 respectivamente. Amostras do grupo A, que apresentam cristalinidade visível a olho nú.

Figura 4.6. Fotos dos cálculos C02 e C08 respectivamente. Amostras do grupo A, que possuem aspecto pastoso e não apresentam cristalinidade visível a olho nú.

O difratograma de raios X da Figura 4.7 indica na amostra C08 apenas colesterol, porém o espectro no IV dessa amostra (Figura 4.4) também evidencia a presença de bandas de absorção de bilirrubinato de cálcio.

Figura 4.7. Difratograma de Raios X, pelo método de pó, da amostra C08, exemplo de cálculo biliar do grupo A, que apresenta formação cristalina de colesterol.

4.3.1.4. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

As amostras do grupo A submetidas à análise por AAS apresentaram teores baixos para os metais analisados, isto já era previsível, visto que nas curvas TG/DTG foram encontrados pequenos teores de resíduos sólidos na temperatura de 900°C (Tabela 4.4). A concentração destes metais em ppb está listada na Tabela 4.7. Deve-se ressaltar que as análises foram realizadas em triplicata e todos os valores encontrados, bem como as diluições utilizadas, média, desvio padrão, limite de detecção e intervalo de confiança estão relatados em tabela no apêndice B.

Tabela 4.7. Concentração média dos metais Cu, Cd e Pb em amostras do grupo A.

Amostras	Concentração Média (ppb)		
	Cu	Cd	Pb
C01	0,01	0,00	0,22
C02	0,03	0,05	0,53
C08	0,00	0,00	1,56
C09	0,09	0,06	3,07
C11	0,00	0,01	0,28
C14	0,02	0,00	1,21

4.3.1.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Estudos de RMN foram realizados a título de confirmar a presença de colesterol nas amostras C01 e C02, pois ambas apresentaram resultados compatíveis com o padrão de colesterol, mas as etapas de perda de massa por TG/DTG deixaram uma dúvida que foi esclarecida com RMN ^1H e RMN ^{13}C . Levantou-se a possibilidade de tratar-se de ergosterol e não de colesterol e análises por RMN poderiam confirmar ou não esta hipótese. Os espectros RMN encontram-se nos anexos. Nas Figuras 4.8 e 4.9 e Tabelas 4.8 e 4.9 estão listados os resultados encontrados e estes comparados ao banco de dados **SDBS- ^1H NMR** SDBS N°887HSP-40-636 e **SDBS- ^{13}C NMR** SDBS N°887CDS-05-861 encontrado no site: www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html.

Figura 4.8. Fórmula Estrutural do colesterol com carbonos e grupos funcionais assinalados com letras.

Tabela 4.8. Resultados de RMN ^1H , comparando valores de deslocamento (δ) em ppm do banco de dados referente à Figura 4.8 e dos resultados experimentais das amostras C01 e C02.

Grupos Assinalados	δ (ppm) Banco de Dados	δ (ppm) C01 Resultados Experimentais	δ (ppm) C02 Resultados Experimentais
A	5,349	5,3484	5,3482
B	3,524	3,5222	3,5218
C	2,28	2,2855	2,2714
L	1,006	1,0085	1,0087
M	0,915	<i>0,9257/0,9038</i>	<i>0,9256/0,9038</i>
P	0,867	<i>0,8733</i>	<i>0,8733</i>
Q	0,862	<i>0,8555</i>	<i>0,8555</i>
R	0,677	0,67904	0,6792

OBS: Os números em itálico correspondem ao deslocamento não muito evidenciado

Figura 4.9. Fórmula Estrutural do colesterol com carbonos numerados.

Tabela 4.9. Resultados de RMN ^{13}C , comparando valores de deslocamento (δ) em ppm referente à Figura 4.9 e valores experimentais das amostras C01 e C02.

Carbonos Numerados	δ (ppm) Banco de Dados	δ (ppm) C01 Resultados Experimentais	δ (ppm) C02 Resultados Experimentais
1	140,80	140,778	140,793
2	121,69	121,728	121,723
3	71,81	71,820	71,822
4	56,80	56,784	56,803
5	56,21	56,172	56,202
6	50,19	50,152	50,181
7	42,35	42,329	42,349
9	39,83	39,801	39,822
10	39,56	39,532	39,544
11	37,31	37,269	37,289
12	36,56	36,519	36,532
13	36,24	36,204	36,220
14	35,81	35,799	35,804
15	31,94	31,922	31,940
17	31,71	31,682	31,698
18	28,24	28,242	28,246
19	28,02	28,025	28,026
20	24,32	24,306	24,314
21	23,89	23,840	23,853
22	22,81	22,825	22,822
22	22,60	22,569	22,569
23	21,15	21,100	21,114
24	19,43	19,406	19,409
25	18,74	18,728	18,738
26	11,89	11,871	11,878

De acordo com os resultados encontrados nos espectros RMN ^1H (Tabela 4.8) e RMN ^{13}C (Tabela 4.9), para as duas amostras (C01 e C02), tem-se que o constituinte principal destes cálculos é realmente o colesterol e não há indícios da presença de ergosterol, uma vez que os deslocamentos deste último são bastante diversos.

4.3.2. Grupo F

Pode-se inferir, pelo conjunto de resultados encontrados para as amostras dos cálculos denominados de C04 e C05, que entre todas as técnicas utilizadas para as análises há indicativos que as mesmas pertençam ao grupo F, de acordo com a classificação da tese de Mercuri, em 2000. Os valores de CHN, as etapas de perda de massa por TG/DTG, os perfis das curvas TG/DTG e DSC, os espectros no IV e os difratogramas de raios X, apresentam grande semelhança, o que permite esta comparação.

4.3.2.1. Estudo termoanalítico das amostras do grupo F.

Duas amostras de cálculos biliares (C04 e C05) foram classificadas como pertencentes ao grupo F. Os perfis das curvas TG/DTG dessas amostras evidenciam que a decomposição térmica inicia-se à temperatura ambiente, entre 20°C e 30°C e são observadas quatro pequenas etapas de perda de massa totalizando 35%, até aproximadamente 450°C. De 450°C a 600°C, verifica-se uma perda de massa de quase 50% e logo após, de 600°C a 700°C, outra variação de pouco mais que 3%, ambas muito semelhantes ao perfil das curvas TG/DTG do padrão de bilirrubinato de cálcio (Mercuri, 2000). Acima de 700°C não se observa nenhum evento e a variação total de massa fica em aproximadamente 90%, indicando que ainda restam quase 10% de material inorgânico nas amostras desse grupo.

As curvas DSC das amostras de cálculos biliares desse grupo apresentam um primeiro evento endotérmico, da temperatura ambiente até pouco acima de 200°C, concordante com às perdas de massa observadas nas curvas TG/DTG. Acima de 250°C inicia-se um evento exotérmico provavelmente relacionado à decomposição (e/ou degradação) térmica de matéria orgânica, com temperatura de pico em

aproximadamente 450°C. Não é observado o evento endotérmico associado ao processo de fusão do colesterol.

Figura 4.10. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C04, representativa do grupo F.

Figura 4.11. Curvas TG comparativas das amostras de cálculos biliares C04 e C05 pertencentes ao grupo F.

A Figura 4.10 ilustra as informações relativas às curvas TG/DTG e DSC e a Figura 4.11 mostra o perfil comparativo das curvas TG das duas amostras desse grupo.

4.3.2.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras do grupo F.

Os espectros no IV (Figura 4.12) das amostras de cálculos biliares, C04 e C05, classificados como grupo F, evidenciam as bandas de estiramento e deformação que indicam a presença de bilirrubinato de cálcio (1664 e 1628 ; 1574 cm^{-1}), e de bilirrubina (1250 e 993 cm^{-1}) em ambas as amostras. Também pode ser constatada a ausência de colesterol, já indicado nas curvas termoanalíticas, especialmente no DSC.

Figura 4.12. Espectros FTIR das amostras C04 e C05 classificadas como grupo F, que apresentam bandas características para bilirrubinato de cálcio e para bilirrubina.

4.3.2.3. Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X das amostras classificadas como grupo F, não apresentam nenhuma formação cristalina, ou seja, são amostras amorfas (Figura 4.13).

Figuras 4.13. Difratogramas das amostras de cálculos C04 e C05 que são considerados amorfos, não apresentando formações de cristais.

4.3.2.4. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

As amostras do grupo F submetidas à análise por AAS apresentaram valores de concentração de metais acima do esperado, ou seja, devido ao alto teor de resíduo sólido encontrado por TG/DTG (Tabela 4.4) a 900°C, era certo que o teor de materiais inorgânicos fosse grande. Porém não se esperava metais tóxicos como chumbo e cádmio. A concentração destes metais em ppb está relacionada na Tabela 4.10. Deve-se ressaltar que as análises foram realizadas em triplicata e todos os valores encontrados, bem como as diluições utilizadas, média, desvio padrão, limite de detecção e intervalo de

confiança estão relatados no apêndice B.

Tabela 4.10. Concentração média dos metais Cd e Pb em amostras do grupo F.

Amostras	Concentração Média (ppb)	
	Cd	Pb
C05	2,27	280
C04	1,98	196

4.3.3. Grupo Intermediário C/D (C₁)

Comparando-se o conjunto de resultados das amostras dos cálculos denominados de C03 e C07, com aqueles obtidos por Mercuri, em 2000, nota-se claramente que há uma correlação entre os mesmos. O perfil das curvas TG/DTG, a presença de colesterol confirmada por DSC, IV e DRX, e ainda a presença de bilirrubinato de cálcio e bilirrubina verificada por IV. Porém, tanto nestas técnicas quanto na análise elementar, os teores de CHN destas amostras não são correspondentes exatamente ao grupo C ou ao grupo D, mas sim a um provável grupo intermediário a C/D (Tabela 4.2). Possivelmente, o mais razoável seria criar um grupo que pudesse ser codificado como C₁, pois no grupo C há presença de colesterol. Enquanto no grupo D não há indícios desta substância.

4.3.3.1. Estudo termoanalítico das amostras do grupo C₁

Duas amostras de cálculos biliares (C03 e C07) apresentam comportamento térmico semelhante. O perfil inicial das curvas TG/DTG, para as duas primeiras etapas de perda de massa são características de amostras do grupo C. A primeira perda de massa ocorre desde a temperatura ambiente (~25°C) até aproximadamente 200°C e pode ser atribuída a perda de água de umidade. A segunda ocorre entre 200°C e 370°C e é correspondente à decomposição térmica das amostras devido à quebra de ligações e a queima de matéria orgânica. Na terceira etapa, de 370°C a 480°C, os perfis das curvas TG/DTG das amostras se diferenciam, apenas em relação às variações no teor de perda de massa, 13% (C03) a 19% (C07). A quarta e última etapa de perda de massa é característica das curvas TG/DTG de amostras do grupo D, onde entre 480°C a 650°C há uma variação de massa que pode ser definida como uma mistura entre os padrões de bilirrubinato de cálcio, bilirrubina e ainda, possivelmente, éster metílico de ácido cólico, tudo

referente aos padrões listados por Mercuri, em sua tese, em 2000. Acima de 700°C não se observa nenhum outro evento térmico e a variação total de massa é de aproximadamente 95,5%, indicando que ainda restam cerca de 4,5% de material inorgânico nas amostras desse grupo.

As curvas DSC das amostras de cálculos biliares desse grupo, apresentam um primeiro evento endotérmico, entre 30°C a 55°C, em média, e corresponde a transição cristalina do colesterol (LOOMIS *et alli*, 1979). O segundo evento, bastante característico, ocorre em torno de 131°C a 163°C e está associado ao processo de fusão da amostra. Acima de 250°C inicia-se um evento exotérmico provavelmente relacionado à decomposição (e/ou degradação) térmica de matéria orgânica, com temperatura de pico em aproximadamente 450°C.

Para ilustrar estas informações, utilizou-se como exemplo a amostra C03 (Figura 4.14) representando o grupo C₁. A Figura 4.15 mostra o perfil comparativo das curvas TG das duas amostras (C03 e C07) desse grupo.

Figura 4.14. Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C03, representativa do grupo denominado C₁.

Figura 4.15. Curvas TG comparativas das amostras de cálculos biliares C03 e C07 pertencentes ao grupo denominado C₁.

4.3.3.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras do grupo C₁

Para as amostras de cálculos biliares, C03 e C07, classificadas como grupo C₁, os espectros no IV (Figura 4.16) evidenciaram as bandas de estiramento e deformação que indicam a presença de bilirrubinato de cálcio (1664 e 1628; 1574 cm⁻¹), e de bilirrubina (1250 e 993 cm⁻¹) em ambas as amostras. Também foram encontradas as bandas de absorção no IV condizentes com aquelas do padrão de colesterol [(1462 e 1440; 1377 e 1365; 1051 cm⁻¹) Tabela 4.6 e Figura 4.3]. As amostras deste grupo apresentam colesterol em quantidades menores do que aquelas encontradas no grupo A (próximo a 95% - Tabela 4.5), mas, ainda assim, bem caracterizadas por todas as técnicas utilizadas.

Figura 4.16. Espectros FTIR das amostras C03 e C07 classificadas como grupo C₁, que apresentam bandas características para colesterol, bilirrubinato de cálcio e bilirrubina.

4.3.3.3. Difração de Raios X

Os difratogramas de raios X (Figura 4.16) das amostras desse grupo intermediário indicam que as mesmas apresentam uma certa cristalinidade. A identificação das espécies foi realizada por meio de comparação com o banco de dados "Data Sets 1-51 plus 70-89 Powder Diffraction File – International Centre for Diffraction, Pensylvania – USA". Sua confirmação está no número das fichas encontradas em cada difratograma. O bilirrubinato de cálcio e a bilirrubina não foram identificados, talvez por não terem sido captados pelo ângulo de incidência dos raios X ou mesmo não estando presente na amostra em sua forma cristalina. A Figura 4.17 indica na amostra C03 e C04 apenas colesterol, sendo que o espectro FTIR das mesmas amostras (Figura 4.16) também indicam bandas de bilirrubinato de cálcio e de bilirrubina.

Figura 4.17. Difratoigramas de Raios X, das amostras C03 e C07, que apresentam cristalinidade relativa ao colesterol e foram classificadas como grupo C₁.

4.3.3.4. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

As amostras do grupo chamado de C₁ submetidas à análise por AAS indicaram a presença de chumbo nas amostras, mas para o cádmio a concentração é muito pequena. A concentração destes metais em ppb está relacionada na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Concentração média dos metais Cd e Pb em amostras do grupo C₁.

Amostras	Concentração Média (ppb)	
	Cd	Pb
C03	0,13	8,51
C07	0,19	7,34

4.3.4. Amostras onde não há concordância com os grupos propostos anteriormente por Mercuri, 2000.

Algumas amostras analisadas não apresentam características que se encaixem adequadamente em nenhum dos grupos anteriormente sugeridos (de A até H), mesmo comparando as curvas TG/DTG/DSC, os espectros de absorção no IV, os difratogramas de raios X, os teores de C H N e os resultados de absorção atômica. Portanto, os resultados para estas amostras serão relatados individualmente, definindo apenas aqueles mais relevantes, seja por se encaixarem em algum padrão ou por diferirem demais de qualquer resultado esperado ou já obtido anteriormente, neste ou em outros trabalhos (MERCURI, 1998 e 2000; TOSCANO, 2003). Apenas os resultados de AAS estão agrupados em uma única tabela.

4.3.4.a. Amostra C06

Esta é uma amostra de cálculo biliar muito diferente de todas as anteriores. Apresenta um leve indício de colesterol ($\sim 1\%$) através de um estudo realizado por DSC em função da comparação entre a área do evento endotérmico (fusão) relativo àquele encontrado para o padrão de colesterol. Todas as amostras que sinalizaram conter colesterol em sua formação foram submetidas a este estudo, e os resultados estão listados na Tabela 4.5. Além disto, há um teor alto de resíduos sólidos a 900°C ($\sim 20\%$ - Tabela 4.4) e ainda apresenta cristais de aragonita, uma forma cristalina de CaCO_3 , não encontrada anteriormente.

4.3.4.a.1. Estudo termoanalítico da amostra C06.

As curvas TG/DTG (Figura 4.18) desta amostra de cálculo biliar evidenciam que sua decomposição térmica se inicia a partir da temperatura ambiente ($\sim 27^{\circ}\text{C}$) e ocorre de forma consecutiva até

aproximadamente 550°C (envolve várias etapas de perda de massa). A última etapa de perda de massa (12,08%) é representativa da decomposição térmica do carbonato de cálcio (CaCO_3) com despreendimento de gás carbônico (CO_2), conforme expresso pela seguinte equação de reação:

Este resultado indica que a partir da quantidade de CO_2 liberada é possível determinar estequiometricamente o teor de CaCO_3 na amostra avaliada, isto é:

De acordo com os cálculos há 27,5% de CaCO_3 na amostra C06.

Figura 4.18. Curvas TG/DTG da amostra de cálculo biliar C06, obtida em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar, com indicação das etapas de perda de massa e suas porcentagens.

A curva DSC da amostra de cálculo biliar C06 (Figura 4.19), apresenta um primeiro evento endotérmico que ocorre por volta de 30°C a 55°C, e está associado a perda de massa observada na TG. Este evento é devido a liberação de água de umidade da amostra. O segundo evento, também endotérmico, entre 140°C-150°C ($T_{\text{pico}} = 146,8^\circ\text{C}$) e está associado ao processo de fusão do colesterol. Através deste pequeno evento endotérmico que podemos estimar a presença de aproximadamente 1% de colesterol, considerando os valores do ΔH comparado aquele do padrão de colesterol (Tabela 4.5).

Figura 4.19. Curva DSC da amostra de cálculo biliar C06, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica N_2 .

4.3.4.a.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra C06.

Nesta amostra, o espectro de absorção no IV (Figura 4.20) evidenciou as bandas de estiramento e deformação que indicam a presença de bilirrubinato de cálcio (1664 e 1628 ; 1574 cm^{-1}), e de

bilirrubina (1250 e 993 cm^{-1}). Também foram observadas as bandas condizentes com aquelas do padrão de colesterol [(1462 e 1440 ; 1377 e 1365 ; 1051 cm^{-1}) Tabela 4.6 e Figura 4.3]. Além disso, também foi possível identificar o CaCO_3 , cristalizado sob a forma de aragonita, quando comparado ao espectro IV da amostra com aquele da aragonita, em padrão de biblioteca de espectros conhecida por "*An Infrared Spectroscopy Atlas for the Coatings Industry, by The Infrared Spectroscopy Committee Chicago Soc. for Coatings Technology - Published by Fed. of Societies for Coatings Technology*".

Figura 4.20. Espectros da amostra de cálculos C06 que apresenta CaCO_3 cristalizado sob forma de Aragonita e padrão de Aragonita da biblioteca de dados.

4.3.4.a.3. Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X da amostra C06 (Figura 4.21) indica a presença da aragonita bem caracterizada, conforme a comparação realizada com o banco de dados "Data Sets 1-51 plus 70-89 Powder Diffraction File – International Centre for Diffraction, Pensylvania – USA", indicado no número das fichas encontradas no difratograma. O

colesterol não foi identificado, talvez devido ao seu baixo teor na amostra ou a heterogeneidade da mesma, não sendo captado pelo ângulo de incidência dos raios X ou mesmo não estando presente na pequena quantidade de amostra suportada na lâminula de vidro.

Figuras 4.21. Difratoograma da amostra de cálculo biliar C06 que apresenta estrutura cristalina de aragonita, muito diferente das encontradas anteriormente.

4.3.4.b. Amostra C10

O cálculo biliar representado pela amostra C10 é também muito diverso dos encontrados anteriormente, não sendo adaptado a nenhum dos grupos propostos e não exibe qualquer padrão de comparação com outras amostras.

4.3.4. b.1. Estudo termoanalítico da amostra C10.

As curvas TG/DTG (Figura 4.22) desta amostra de cálculo biliar evidenciam que sua decomposição térmica se inicia a partir da temperatura ambiente ($\sim 27^{\circ}\text{C}$) e várias etapas de perda de massa ocorrem até 750°C . Porém, as porcentagens de perda de massa e as

variações de temperatura, não podem ser equiparadas com a amostra anterior. Na curva DSC nota-se que o evento endotérmico que caracteriza a fusão do colesterol é bastante sutil e no estudo de teor de colesterol através da entalpia de fusão da amostra, verifica-se uma fração de aproximadamente 1%. Entre 75°C e 135°C há eventos endotérmicos indicados por um pico com ombro e outros menos intensos, nada parecido com os perfis de DSC de substâncias padrões. Nesta faixa de temperatura, pode-se observar que na curva TG/DTG ocorre perda de massa e parte deste evento pode ser referente à eliminação de água. Também é observável um teor de sólidos inorgânicos de 19% a 900°C (Figura 4.22).

Na tentativa de se caracterizar melhor essa amostra, os ensaios de Termogravimetria foram repetidos para que pudessem ser isolados os produtos sólidos da decomposição térmica na temperatura de 300°C e 500°C. Esses materiais foram caracterizados por espectroscopia no IV.

Figura 4.22. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C10, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

4.3.4.b.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra C10

Comparando-se os espectros no IV dos produtos de decomposição térmica isolados a 300°C e a 500°C com aquele da amostra original, pode-se observar que as bandas de absorção no IV relativas ao colesterol e a bilirrubina desaparecem, respectivamente, a 300°C e a 500°C. porém aquelas relativas ao bilirrubinato de cálcio tornaram-se de menor intensidade. Ao mesmo tempo, nota-se uma intensificação nas bandas de absorção no IV (1448 e 876 cm^{-1}) correspondentes ao CaCO_3 . Também pode ser observado a intensificação das bandas de absorção em 1040 , 601 e 558 cm^{-1} , correspondente à presença de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Essa intensificação é devida a eliminação da matéria orgânica presente na amostra original.

Figura 4.23. Espectros da amostra de cálcio C10, e dos respectivos resíduos após isotermas a 300°C e a 500°C.

4.3.4.b.3. Difração de Raios X (DRX)

O difratograma de raios X da amostra C10, ilustrado na Figura 4.24 evidencia a presença de colesterol, conforme a comparação com o banco de dados "Data Sets 1-51 plus 70-89 Powder Diffraction File – International Centre for Diffraction, Pensylvania – USA". Sua confirmação está no número das fichas encontradas abaixo de cada difratograma, presentes no anexo. O bilirrubinato de cálcio e a bilirrubina não foram identificados, apesar de estarem bem evidenciados nos espectros FTIR. Talvez não foram captados pelo ângulo de incidência dos raios X ou mesmo não estão presentes na amostra em sua forma cristalina.

Figuras 4.24. Difratograma da amostra de cálculo biliar C10 que apresenta estrutura cristalina somente de colesterol, apesar de conter apenas 1% deste.

4.3.4.c. Amostra C12

O cálculo biliar representado pela amostra C12 apresenta alguma semelhança com o cálculo C10. Porém, o primeiro não tem indicações de colesterol por análise térmica como no segundo. A princípio pensou-se classificar um novo grupo, porém as diferenças confirmadas com FTIR e DRX, além da já evidenciada na curva DSC, não permitiram essa nova classificação.

4.3.4.c.1. Estudo termoanalítico da amostra C12.

As curvas TG/DTG (Figura 4.25) desta amostra de cálculo biliar evidenciam que a sua decomposição térmica se inicia a partir da temperatura ambiente ($\sim 27^\circ\text{C}$) e várias etapas de perda de massa podem ser observadas até 700°C . As porcentagens de perda de massa e as variações de temperatura, não podem ser equiparadas com a amostra C10. A curva DSC não apresenta o evento endotérmico que caracteriza a fusão do colesterol. Entre 75°C e 135°C há eventos endotérmicos indicados por um pico com ombro, semelhante ao observado para a amostra C10, mas nada parecido com os perfis de DSC de substâncias padrões. Este também aparenta ter mais de um pico sobreposto, mas ao contrário da amostra anterior, nesta mesma faixa de temperatura, a perda de massa relativa a esta etapa é menor ($\sim 1,6\%$ - Tabela 4.4). Ainda assim, parte do evento pode estar associado à perda de água. O teor de resíduos sólidos desta amostra a 900°C é de apenas 6%, enquanto para amostra C10 é da ordem de 19%.

Figura 4.25. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C12, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

4.3.4.c.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra C12

Na amostra C12, o espectro no IV (Figura 4.26) evidenciou as bandas de estiramento e deformação que indicam a presença de bilirrubinato de cálcio (1664 e 1628 ; 1574 cm^{-1}) bem evidentes, porém as bandas que identificam a bilirrubina (1693 ; 1645 ; 1250 e 993 cm^{-1}) não são tão nítidas. Também foram encontradas as bandas de absorção no IV condizentes com aquelas observadas no padrão de colesterol [(1462 e 1440 ; 1377 e 1365 ; 1051 cm^{-1}) Tabela 4.6].

Figura 4.26. Espectro da amostra de cálculo C12 que apresenta bandas de caracterização de bilirrubinato de cálcio, colesterol e bilirrubina.

4.3.4.c.3. Difração de Raios X (DRX)

O difratograma de raios X da amostra C12 (Figura 4.27) indica a presença da forma cristalina do colesterol, conforme a comparação realizada com o banco de dados "Data Sets 1-51 plus 70-89 Powder

Difraction File – International Centre for Diffraction, Pennsylvania – USA”. Sua confirmação está no número das fichas encontradas em cada difratograma. O bilirrubinato de cálcio não foi identificado, apesar de evidenciados no espectro FTIR. Talvez não foram captados pelo ângulo de incidência dos raios X ou mesmo não estão presentes na amostra em sua forma cristalina.

Figuras 4.27. Difratograma da amostra de cálculo biliar C12 que apresenta estrutura cristalina somente de colesterol, apesar deste não estar evidenciado na curva DSC.

4.3.4.d. Amostra C13

O cálculo biliar representado pela amostra C13 apresenta certa similaridade com o cálculo C06, basicamente o que os diferencia é a presença de colesterol em C06 e não em C13, e o alto teor de resíduos sólidos em C13 a 900°C , cerca de 27%, o maior encontrado neste trabalho. Também nesse caso pensou-se na possibilidade de propor um novo grupo de classificação para os cálculos biliares. Porém, as

diferenças observadas nos resultados de TG/DTG/DSC, confirmadas com FTIR, DRX e AA, o novo grupo não pode ser proposto.

4.3.4.d.1. Estudo termoanalítico da amostra C13

As curvas TG/DTG (Figura 4.28) desta amostra de cálculo biliar indicam que sua decomposição térmica se inicia a partir da temperatura ambiente ($\sim 27^\circ\text{C}$) e cinco etapas de perda de massa podem ser observadas até 750°C . A última etapa de perda de massa é representativa da decomposição térmica do carbonato de cálcio (CaCO_3), com despreendimento de gás carbônico (CO_2) de acordo com a equação de reação:

Portanto, o teor de CaCO_3 que está presente na amostra avaliada, pode ser determinado segundo os cálculos estequiométricos:

	CaCO_3	$\rightarrow$	CaO	$+$	CO_2
(Massas Molares)	100g mol^{-1}		56g mol^{-1}		44g mol^{-1}
(Cálculo de porcentagem)	34,4%		←.....		15,13%

De acordo com os cálculos há 34,4% de CaCO_3 nessa amostra.

A curva DSC (Figura 4.28) da amostra C13 é semelhante àquelas das amostras do grupo F, apresentando um primeiro evento endotérmico, da temperatura ambiente até pouco acima de 200°C , associada à pequena perda de massa observada nas curvas TG/DTG. Acima de 250°C observa-se um evento exotérmico que provavelmente está relacionado à decomposição e/ou degradação térmica de matéria orgânica, com temperatura de pico em aproximadamente 450°C . Não há evidências do evento endotérmico associado ao processo de fusão do colesterol.

Figura 4.28. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C13, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

4.3.4.d.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra C13

Nesta amostra, o espectro de absorção no IV (Figura 4.29) evidenciou as bandas de estiramento e deformação que indicam a presença de bilirrubinato de cálcio (1664 e 1628 ; 1574 cm^{-1}), e de bilirrubina (1250 e 993 cm^{-1}). Também foi possível identificar a presença de CaCO_3 , cristalizado sob a forma de aragonita (1493 e 855 cm^{-1}), a partir da comparação do espectro da amostra com aquele da Aragonita, existente na biblioteca de espectros conhecida por "An Infrared Spectroscopy Atlas for the Coatings Industry, by The Infrared Spectroscopy Committee Chicago Soc. for Coatings Technology - Published by Fed. of Societies for Coatings Technology".

Figura 4.29. Espectro da amostra de cálculo C13 que apresenta bandas de caracterização de bilirrubinato de cálcio, bilirrubina e CaCO_3 sob a forma de Aragonita e Calcita (bandas grifadas).

4.3.4.d.3. Difração de Raios X

O difratograma de Raios X da amostra C13 (Figura 4.30) permite identificar a presença das formas cristalinas de aragonita e calcita, caracterizadas meio de comparação com o banco de dados "*Data Sets 1-51 plus 70-89 Powder Diffraction File – International Centre for Diffraction, Pennsylvania – USA*". Sua identificação está no número das fichas encontradas no difratograma.

Figuras 4.30. Difratograma da amostra de cálculo biliar C13 que apresenta estrutura cristalina de CaCO_3 , cristalizado sob a forma de aragonita (vermelho) e Calcita (azul).

4.3.4.e. Amostra C15

Esta amostra é a que mais se assemelha às aquelas encontradas no grupo F. Porém as curvas TG/DTG evidenciam um número maior de perdas de massa e uma maior quantidade de resíduo sólido isolado a 900°C. Também os teores de CHN são um pouco diversos, especialmente o teor de carbono, que é menor que aquele encontrado para as do grupo F. Os teores de H e N, apesar de pouco menores, são bastante próximos (ver Tabela 4.2).

4.3.2.e.1. Estudo termoanalítico da amostra C15

As curvas TG/DTG (Figura 4.31) da amostra desse cálculo biliar, evidenciam que a decomposição térmica inicia-se à temperatura ambiente, até 100°C, e a perda de massa é de aproximadamente 7%. Entre 200°C e 650°C, ocorrem perdas de massa consecutivas que totalizam ~63%. Ainda pode-se observar entre 650 e 800°C uma perda de massa caracterizada decomposição térmica de CaCO_3 . A variação total de massa fica em aproximadamente 78%, indicando que ainda restam mais de 22% de material inorgânico nessa amostra.

A curva DSC dessa amostra de cálculo biliar evidencia um primeiro evento endotérmico, da temperatura ambiente até pouco acima de 200°C, associadas às perdas de massa observadas nas curvas TG/DTG. Acima de 250°C observa-se um evento exotérmico provavelmente relacionado à decomposição (e/ou degradação) térmica de matéria orgânica, com temperatura de pico em aproximadamente 450°C.

Figura 4.31. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C15, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

4.3.4.e.2. Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da amostra C15.

Nesta amostra, o espectro de absorção no IV (Figura 4.32) evidenciou as bandas de estiramento e deformação que indicam a presença de bilirrubinato de cálcio (1664 e 1628 ; 1574 cm^{-1}), e de bilirrubina (1250 e 993 cm^{-1}). Outras bandas de absorção são observadas, possivelmente devido a algum sal biliar ou éster.

4.3.4.e.3. Difração de Raios X (DRX)

O difratograma de raios X da amostra C15 (Figura 4.33) é característico de material que não apresenta formação cristalina, isto é, de um sólido amorfo.

Figura 4.32. Espectro da amostra de cálculo C15 que apresenta bandas de caracterização de bilirrubinato de cálcio e bilirrubina.

Figuras 4.33. Difratoograma da amostra de cálculo C15 que é considerados amorfos, não apresentando formações de cristais.

4.3.4.4. Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

Os resultados dos teores de metais pesados (traços) dos cálculos que não corresponde à classificação proposta por Mercuri, em 2000, estão listados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Concentração média dos metais Cd e Pb nas amostras C06, C10, C12, C13 e C15

Amostras	Concentração Média (ppb)	
	Cd	Pb
C06	0,47	95
C10	0,07	36,4
C12	0,03	20,4
C13	6,72	940
C15	3,93	470

Observa-se que há uma relação entre o teor de resíduos sólidos (materiais inorgânicos) isolados a 900°C por TG/DTG, com a quantidade média dos metais encontrados. As amostras C13 e C15, que possuem altas taxas de metais, são também as que apresentaram maior porcentagem de materiais inorgânicos, 27,2% e 22,1%, respectivamente.

4.4. Biles

Não há uma correlação entre os teores, concentrações ou tipos de substâncias entre as biles e os respectivos cálculos. O que alguns autores parecem concordar (VITETTA *et alii*, 2000; NAKAI *et alii*, 2003; XIE *et alii*, 2003) é que pode haver uma relação entre a bile infectada com bactérias e o tipo de cálculo formado. Outros estudos revelam que a concentração da bile é muito instável e que pode variar dentro de algumas horas, em um mesmo dia, dependendo da quantidade e do tipo de alimento ingerido, e do intervalo de tempo entre sua alimentação e, além, naturalmente do próprio metabolismo individual de cada paciente. Ou seja, cálculos extremamente parecidos, como C01 e C02, apresentam as biles correspondentes B01 (amorfa) e B02 (presença de cristais de colesterol e halita) muito diferentes entre si, especialmente visualizadas nas curvas TG/DTG/DSC dessas amostras (Figura 4.34 e 4.35).

Figura 4.34. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile vesicular B02, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

A partir das curvas TG/DTG/DSC e dos espectros FTIR, sempre há indicação da presença de bilirrubinato de cálcio e bilirrubina, porém em quantidades muito variadas, podendo ainda haver sais biliares e éster metílico de ácido cólico.

Outro resultado interessante deste estudo foi a existência de seis amostras de biles com formação cristalina de halita (NaCl), conforme identificado pelos difratogramas de raios X, onde anteriormente, só havia sido encontrado amostras de bile amorfa (MERCURI, 2000). Observou-se, também, numa delas a presença de halita e ainda uma amostra com halita e colesterol (Figura 4.35).

Figuras 4.35. Difratoograma da amostra de bile vesicular B02, que apresenta estrutura cristalina de colesterol (vermelho) e NaCl cristalizado em forma de halita (azul).

Capítulo 5

Considerações Finais

5-Considerações Finais

Após a realização deste trabalho, onde se avaliou química e termoanaliticamente amostras de cálculos biliares e bile vesicular humana de pacientes do sexo masculino, foi possível concluir que:

1. O universo de cálculos biliares masculinos concorda em algumas situações e difere em outras, das amostras de ambos os sexos caracterizadas por Mercuri, em 2000, sendo:

1.1. A porcentagem de cálculos formados essencialmente de colesterol é menor para pacientes do sexo masculino do que nas amostras sem distinção de sexos, e menor ainda se considerado somente o universo feminino;

1.2. Apenas as amostras classificadas como cálculos de colesterol (C01, C02, C08, C09, C11 e C14), encaixam-se no grupo A e as amostras C04 e C05, que se enquadram no grupo F, (Mercuri, em 2000) sem restrições. Outras duas amostras, C03 e C07 se assemelham aos grupos propostos C e/ou D, mas não são bem caracterizados. Seria adequado propor um grupo intermediário aos grupos C e D (C_1);

1.3. Outros grupos poderiam ser sugeridos, mas não houve muita correlação entre os resultados das outras amostras, ou seja, cada uma apresentou peculiaridades e semelhanças entre si, ao mesmo tempo.

2. O estudo do teor de colesterol realizado por DSC, revelou a possibilidade de variações de 1 a 99% de colesterol nos cálculos biliares avaliados.

3. A análise do teor de metais (Cd, Pb e Cu) presentes nas amostras, feito por AAS, foi singularmente correlacionado aos teores de sólidos inorgânicos isolados nas curvas TG/DTG, ou seja, quanto maior a porcentagem de resíduos sólidos, maior a quantidade de metais encontrados.

4. Nas amostras C13 e C15, o teor de chumbo presente, respectivamente, 940 ppb e 470 ppb é preocupante. Valores próximos a 0,5 e 1 ppm, podem significar uma contaminação do indivíduo. Estes casos, especialmente o paciente doador da amostra C13, deveriam ser

cl clinicamente e quimicamente reavaliados. Possivelmente, mediante exames clínicos e análises químicas de metais em sangue, urina e etc., pudessem sugerir uma proposta de mecanismo de formação de cálculos. Acredita-se que, rastreando o metal presente no organismo do paciente, seria possível inferir se o mesmo concentrou-se na vesícula biliar e conduziu à precipitação do cálculo, ou, se o teor encontrado nos exames clínicos não tem uma relação direta com o acumulado na vesícula biliar.

5. A utilização de RMN para verificação e ratificação da presença de colesterol nas amostras C01 e C02 foi importante para afastar de a possibilidade da presença de ergosterol nessas e em outras amostras.

6. As amostras de bile confirmam não haver correlação entre o tipo de cálculo e a respectiva bile, pois cálculos pertencentes ao mesmo grupo apresentam biles muito diferentes.

7. Os resultados obtidos por DRX, foram muito importantes na avaliação dos cálculos e bile, mas especialmente na identificação de cristais de halita (NaCl) em seis amostras de bile, onde, nos estudos anteriores, só haviam biles amorfas. Aqui também há uma divergência entre as amostras estudadas por Mercuri, em sua Tese de doutorado, em 2000.

8. Os espectros no FTIR confirmaram conter as espécies que as curvas TG/DTG e DSC, a análise elementar e o DRX indicaram, porém, onde não se encontrava cristais de sais biliares, bilirrubinato de cálcio e bilirrubina por DRX, mas havia indicações destes nas curvas TG/DTG, os espectros no FTIR revelaram com clareza a existência ou não das bandas de absorção de tais espécies.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER KS, DOLLIMORE D, DUNN JG, GAO X, PATEL D. *Thermochimica Acta*, 215: 171-181 Feb 26 1993.

APSTEIN, M.D. & CAREY, M.C. – Biliary tract Stones and associated diseases. In: Stein, J.H., editor. *Internal Medicine*, 4 th ed. St. Louis: Mosby Yearbook. In press, 1993.

BECKER, E. D., *Anal. Chem.*, 65, 295 A, 1993.

BOCKUS, H.L. *Gastroenterology*. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1985.

BENNETT, R., DAVIES, J.E., HURSTHOUSE, M.B. Structure of Bilirubin. *Nature*, v.262, p.326-328, 1976.

CAREY, M.C. Patogenesis of gallstones. *Am. J. Surg.* v.165, p410-419, 1993.

VAN ERPECUM, K. J. Cholesterol-gallstone formation: More than a biliary lipid defect? *J. Lab. Clin. Med.* v.144, p. 121-123, 2004.

FIELDS, L.D., STERNHELL S. *Analytical NMR*, Eds New York: Wiley, 1989.

GRANADOS, H., CÁRDENAS, R. Calculos biliares en el Hamster Dorado. XXXVII. Acción de "Gobernadora" (*Larrea tridentata*) en la colelitiasis pigmentaria producida por la vitamina A. *Rev. Gastroenterol. Mex.* v.59(1), p. 31-35, 1994.

HAI, S., ZENG,F.Q., TONG,H., NIU,F., GU,Y.H., JIN,L.F., ZHAI,D.K. Analysis of pearl gallstone by infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. *Fenxi-Ceshi-Xuebao* v19(4), p.74-76, 2000.

HAINES,P.J. Thermal methods of analysis principles, applications and problems. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995.

IONASHIRO, M., GIOLITO,I. Nomenclatura, padrões e apresentações de resultados em análise térmica. *Cerâmica*, v.26, n.121, p.17-24, 1980.

KING, R.W., WILLIAMS,K.R., *J. Chem. Educ.*, 66, A213, A243, 1989; 67, A93 A125, 1990.

LANKIN D.C., FERRARO, R.R., JARNUTOWSKI, R. *Spectroscopy*, 7 (8), 18, 1992.

LEITZMAN, M.F., RIMM, E.B., WILLETT, W.C. *et al.*. Recreational physical activity and the risk of cholecystectomy in women. *N. Engl. J. Med.* v.341, p.777-784. 1999.

LOOMIS, C.R., SHIPLEY, G.G., SMALL, D.M. The phase behavior of hydrated cholesterol. *J. Lipid. Res.*, v.20, p.525-535, 1979.

McNAUGHTAN, J.L., MORTIMER, C.D. Differential scanning calorimetry. Perkin Elmer, Norwalk, s/d. [Extraído de IRS, Physical Chemistry, series 2, v.10, London: Butherworths,1975].

MACHADO,L.D.B., MATOS, J.R. Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial. [Extraído de CANEVAROLO Jr, S.V. Técnica de caracterização de polímeros. Artliber Ed., p.228-245, São Paulo, 2004].

MARQUES, A.F.P., Biofisiologia da colelitíase biliar: II.Mecanismo de formação de cálculos biliares. *Revista Port. Farm.*, v.XLIII, n.3, p.5-16,1993.

MATOS, J.R., MACHADO,L.D.B. Análise Térmica- Termogravimetria. [Extraído de CANEVAROLO Jr, S.V. Técnica de caracterização de polímeros. Artliber Ed., p.209-228, São Paulo, 2004].

MERCURI, L.P., CIRINO, L.M.I., MARGARIDO, N.F., MATOS, J.R. Estudo termoanalítico e caracterização química da litíase biliar. *Rev. Med. HU-USP*, v.8, n.2, p., jul./dez. 1998.

MERCURI, L.P. *Estudo termoanalítico e caracterização química de cálculos biliares e bile humana*. São Paulo, 2000. [Tese de Doutorado – Instituto de Química – USP].

MIYANO, M.H., NARIMATSU, L.E.S., WANDERMUREN, M. N., MATOS, J.R. Resultados de Análise Elementar associados à termogravimetria. *An. Assoc. Brás. De Quím.*, v.45, n.4, p.185-190.

NAKAI, K., TAZUMA, S., NISHIOKA, T., KAZUAKI, C. Inhibition of cholesterol crystalization of mechanisms whereby infected bile accelerates pigments stone formation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1623, p.48-54, 2003.

NAKAIE, M. *Incidência de Colelitíase em autópsias no município de São Paulo*. São Paulo,1980. p.122-135. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina – USP).

NAOZUKA, J., OLIVEIRA, P.V. PEDROTTI, J.J. Eletrodeposição de irídio em tubo de grafite como modificador químico permanente em

espectrometria de absorção atômica, *Química Nova*, 26/6 (2003) 934-937.

PERKIN ELMER CORPORATION. Elemental analyser CHN 400. Norwalk, 1988. Manual de Instruções.

POHL, P. Recent advances in chemical vapour erosion via reaction with sodium tetrahydroborate, *Trends in Analytical Chemistry*, 23/1 (2004) 21-27.

RAIA A. A., ZERBINI, E.J. *Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Neto*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1988. p.830-839.

ROCHA, A.A. Litíase da Vesícula Biliar em Material de Autópsia no Triângulo Mineiro. *Revista Ass. Med. Brasil*. V.23, p.196-198, 1977.

SAMPLINER, R.E., BENNETT, P.H., COMMESS, L.J. Gallbladder disease in Pima Indians: demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. *N. Engl. J. Med.*, v.283, p.1358, 1970.

SHAN, T. C. Uso de microfrascos de digestão em forno de microondas focalizadas como uma alternativa para preparação de amostras. São Paulo, 2002. p.29-36. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – USP).

SHIMADZU CORPORATION. Analytical Instruments Division. Differential Scanning Calorimetry DSC-50. Japan, 1989. [*Manual de Instruções*].

SHIMADZU CORPORATION. Testing and Weighing Equipment Division. Thermogravimetry Analyser TGA-50 e RGA- 51H. Japan, 1989, 1995. [*Manual de Instruções*].

SIMA, J., KYCHLOVSKY, P. Eletrochemical selenium hydride generation with in situ trapping in graphite tube atomizers, *Spectrochimica Acta*, 57B (2002) 919-930.

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. NIEMAN, T.A. *Princípios de análise instrumental*, 5ªEd, Rio de Janeiro, p. 399-432, 2002.

STEDMAN, T.I. *Stedman Dicionário Médico*. 25 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.243, 541, 845.

STRASBER, S.M., CLAVIEN, P.A. Overview of Therapeutic Modalities for the Treatment of Gallstones Diseases. *The Am. J. Surg.*, v.165, p.420-426, 1993.

SUTOR, D.J., WOOLEY, S.E. A statistical survey of the composition of gallstones in eight countries. *Gut*, v.12, p.55-64, 1971.

TOSCANO, R.A., MELO, D.M.A., MOURA, M.F.V., FARIAS, R.F. TG and DSC investigation of gallstone samples collected from patients submitted to cholecystectomy. *Thermochimica Acta*, v. 410, p. 125-131, 2004.

TSALEV, D. Vapor Generation or electrothermal atomic absorption spectrometry? – Both!, *Spectrochimica Acta*, 55B, p. 917-933, 2000.

VERMA, G.R., PANDEY, A.K., BOSE, S.M., PRASAD, R. Study of serum calcium and trace elements in chronic cholelithiasis. *ANZ J. Surg.* v.72, p. 569-599, 2002.

VITETTA, L., BEST, S.P., SALI, A. Single and multiple cholesterol gallstones and the influence of bacteria. *Medical Hypotheses*. v. 55 (6), p. 502-506, 2000.

WELZ, B., SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Alemanha, 1999.

WENDLANDT, W.W. *Thermal Analysis*. 3 ed. New York: Wiley, 1986.

WHITING, M.J., BRADLEY, B.M., WATTS, J.M. Chemical and physical properties of gallstones in South Australia: implications for dissolution treatment. *Gut*, v.24, p.11-15, 1983.

XIE, A., SHEN, Y., HUANG, F. Study on the relationship between the gallstone formation and the properties of patient bile. *J. Inorg. Biochem.* v.96, p.252, 2003.

ZENG, F.Q., HAI, H., JIN, L.F. Analysis of infrared spectrum of human body gallstone with comparative method. *Guangpuxue-Yu-Guangpu-Fenxi*, v.21(3), p.314-316, 2001.

Apêndice A

Curvas TG/DTG e DSC

Figura 4.36. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C01, obtidas em $\beta = 10 \text{ Cmin}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

Figura 4.37. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C02, obtidas em $\beta = 10^\circ\text{Cmin}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

Figura 4.38. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C09, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

Figura 4.39. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C11, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

Figura 4.40. Curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar C14, obtidas em $\beta = 10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 , respectivamente.

Apêndice B

Tabelas de Resultados AAS

Tabela 4.13. Valores das diluições utilizadas, branco, curva de calibração, média, desvio padrão, limite de detecção e concentração de Cd nas amostras.

Cd (ppb)	A1	A2	Amedi	SD	RSD	A-bco
0	0,00138	0,000585	0,000983	0,000562	57,21627	0
0,5	0,009648	0,01158	0,010614	0,001366	12,87102	0,009631
1	0,0206	0,02082	0,02071	0,000156	0,751152	0,019727
2,5	0,04691	0,04859	0,04775	0,001188	2,487831	0,046767
4	0,0916	0,09154	0,09157	4,24E-05	0,046332	0,090587

y=0,0214x													
posicao	amostra	massa(g)	dil	A	A	Amedia	sd	rsd	A-bco	diluicao	C(ppb)	m(micrograma)	m(mg/kg)
1	B1	-	-	0,000277		0,000277	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,00172				
2	B2	-	-	0,001072		0,001072	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,00092				
3	B3	-	-	0,002141		0,002141	#DIV/0!	#DIV/0!	0,000146				
4	C1	0,01504	-	0,001896	0,001121	0,001509	0,000548	36,32799	-9,9E-05	-0,00010	0,00	-9,3E-06	-0,00062
5	C2	0,0151	-	0,003034	0,002789	0,002912	0,000173	5,950237	0,001039	0,00104	0,05	9,71E-05	0,006431
6	C5	0,01496	-	0,05059	0,05002	0,050305	0,000403	0,801214	0,048595	0,04860	2,27	0,004542	0,303582
7	C6	0,01506	-	0,01204	0,01275	0,012395	0,000502	4,05039	0,010045	0,01005	0,47	0,000939	0,062336
8	C7	0,01526	-	0,004725	0,005569	0,005147	0,000597	11,59507	0,00273	0,00273	0,13	0,000255	0,01672
9	C8	0,015	-	0,001332	0,002517	0,001925	0,000838	43,5397	-0,00066	-0,00066	-0,03	-6,2E-05	-0,00413
10	C9	0,01515	-	0,003174	0,003192	0,003183	1,27E-05	0,399872	0,001179	0,00118	0,06	0,00011	0,007273
11	C10	0,01502	-	0,003508	0,004565	0,004037	0,000747	18,51634	0,001513	0,00151	0,07	0,000141	0,009414
12	C11	0,01516	-	0,002204	0,001149	0,001677	0,000746	44,49733	0,000209	0,00021	0,01	1,95E-05	0,001288
13	C12	0,0151	-	0,002552	0,003892	0,003222	0,000948	29,40792	0,000557	0,00056	0,03	5,21E-05	0,003447
14	C13	0,01504	-	0,03075	0,02862	0,029685	0,001506	5,073732	0,028755	0,14378	6,72	0,013437	0,893412
15	C14	0,01515	-	0,002061	0,000926	0,001494	0,000803	53,73727	6,6E-05	0,00007	0,00	6,17E-06	0,000407
16	C15	0,01504	-	0,08613	0,0893	0,087715	0,002242	2,555468	0,084135	0,08414	3,93	0,007863	0,522811

Calculo		LD	LQ
1	0,002392	0,002392	0,002392
2	0,001072	0,001072	0,001072
3	0,002141	0,002141	0,002141
4	0,000206	0,000206	0,000206
5	0,000332	0,000332	0,000332
6	0,001542	0,001542	0,001542
7	0,001673	0,001673	0,001673
8	0,001446	0,001446	0,001446
9	0,001916	0,001916	0,001916
10	0,001308	0,001308	0,001308
sd	0,000713	0,000713	0,000713
3*sd	0,00214	0,00214	0,007132
ppb	0,099987	0,099987	0,333291

Tabela 4.13. Valores das diluições utilizadas, branco, curva de calibração, média, desvio padrão, limite de detecção e concentração de Pb nas amostras.

Pb (ppb)	A1	A2	Amedi	SD	RSD	A-bco
0	0,001753	0,000866	0,00131	0,000627	47,89643	0
5	0,01708	0,01846	0,01777	0,000976	5,491319	0,01646
10	0,03174	0,03455	0,033145	0,001987	5,994781	0,031835
20	0,06383	0,06743	0,06563	0,002546	3,87869	0,06432
30	0,09485	0,09394	0,094395	0,000643	0,681675	0,093085
40	0,1216	0,1249	0,12325	0,002333	1,893268	0,12194
50	0,1451	0,1469	0,146	0,001273	0,871775	0,14469

y=0,003x													
posicao	amostra	massa(g)	dil	A	A	Amedia	sd	rsd	A-bco	diluicao	C(ppb)	m(micrograma)	m(mg/kg)
1	B1		-			#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,00968				
2	B2		-	0,01073	0,008113	0,009422	0,00185	19,64123	0,00105				
3	B3		-	0,007923	0,01195	0,009937	0,002848	28,65716	-0,00176				
4	C1	0,01504	-	0,01035	0,01296	0,011655	0,001846	15,83482	0,00067	0,00067	0,22	0,000447	0,029699
5	C2	0,0151	-	0,01128	0,00951	0,010395	0,001252	12,0402	0,0016	0,00160	0,53	0,001067	0,07064
8	C7	0,01526	-	0,03521	0,04005	0,03763	0,003422	9,094863	0,02553	0,02553	8,51	0,01702	1,115334
9	C8	0,015	-	0,01435	0,01167	0,01301	0,001895	14,56607	0,00467	0,00467	1,56	0,003113	0,207556
10	C9	0,01515	-	0,01889	0,02677	0,02283	0,005572	24,40649	0,00921	0,00921	3,07	0,00614	0,405281
11	C10	0,01502	-	0,1188	0,1088	0,1138	0,007071	6,213592	0,10912	0,10912	36,4	0,072747	4,84332
12	C11	0,01516	-	0,01052	0,009733	0,010127	0,000556	5,495413	0,00084	0,00084	0,28	0,00056	0,036939
13	C12	0,0151	-	0,07092	0,0792	0,07506	0,005855	7,800219	0,06124	0,06124	20,4	0,040827	2,703753
15	C14	0,01515	-	0,0133	0,01714	0,01522	0,002715	17,84028	0,00362	0,00362	1,21	0,002413	0,159296
19	C6	0,01506	3	0,1051	0,1003	0,1027	0,003394	3,304881	0,09542	0,28626	95	0,19084	12,67198
22	C5	0,01496	10	0,09368	0,09891	0,096295	0,003698	3,840457	0,084	0,84000	280	0,56	37,43316
23	C13	0,01504	20	0,1507	0,1256	0,13815	0,017748	12,84718	0,14102	2,82040	940	1,880267	125,0177
24	C15	0,01504	20	0,08019	0,08767	0,08393	0,005289	6,301869	0,07051	1,41020	470	0,940133	62,50887

LD
0,001753
0,000866
0,006993
0,008398
0,003247
0,00974
3,24659

Apêndice C

Espectros RMN

RMN ¹³C - Amostra C01

Current Data Parameters
 NAME Claudia
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20040811
 Time 18.14
 INSTRUM spect
 PROBO 5 mm TXI 13C Z
 PULPROG zgpg30
 ID 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 20570
 DS 4
 SMH 32679.738 Hz
 FIDRES 0.498653 Hz
 AQ 1.0027508 sec
 RG 32768
 DM 15.300 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 d12 0.0002000 sec

***** CHANNEL f1 *****
 NUC1 13C
 P1 12.70 usec
 PL1 0.00 dB
 SF01 125.7716224 MHz

***** CHANNEL f2 *****
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 21.00 dB
 PL13 21.00 dB
 SF02 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7577670 MHz
 NH 1
 SSF 0
 LB 2.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

ID NMR plot parameters
 CX 23.00 cm
 CY 7.00 cm
 ZP 230.000 ppm
 F1 28924.29 Hz
 F2P -10.000 ppm
 F2 -1257.58 Hz
 NUCM 10.43478 ppm/cm
 NZCM 1312.25525 Hz/cm

RMN ^{13}C - Amostra C01

RMN ¹³C - Amostra C01

RMN ¹H - Amostra C01

RMN ¹H - Amostra C01

RMN ¹H - Amostra C01

RMN ¹³C - Amostra C02

Current Data Parameters
NAME C1audia
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20040812
Time 10:58
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 2165
DS 0
SWH 21097.047 Hz
FIDRES 0.321915 Hz
AQ 1.5532532 sec
RG 32768
DM 23.700 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
d12 0.00020000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
P1 8.40 usec
PL1 6.00 dB
SF01 75.4760505 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 90.00 usec
PL2 3.00 dB
PL12 21.66 dB
PL13 120.00 dB
SF02 300.1312005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4677464 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

1D NMR plot parameters
CX 23.00 cm
CY 12.50 cm
F1p 230.0000 ppm
F1 17367.58 Hz
F2p -10.000 ppm
F2 -754.68 Hz
OPNCH 10.43478 ppm/cm
HZCN 787.48950 Hz/cm

RMN ¹³C - Amostra C02

RMN ¹H - Amostra C02

Current Data Parameters
NAME Claudia
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20040915
Time 15 17
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 0
SWH 3360.215 Hz
FIDRES 0.051273 Hz
AQ 9.7518072 sec
RG 512
DM 148.800 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1 1H
P1 9.50 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 300.1314165 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300059 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 23.00 cm
CY 12.50 cm
F1P 10.000 ppm
F1 3001.30 Hz
F2P -0.500 ppm
F2 -150.07 Hz
PPHOM 0.45652 ppm/cm
HZCM 137.01587 Hz/cm

RMN ¹H - Amostra C02

RMN ^1H - Amostra C02