(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo Termoanalítico e Caracterização Química de Cálculos Biliares e Bile Humana

Lucildes Pita Mercuri

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos
Co-orientador: Dr. Luis Marcelo Inaco Cirino

São Paulo
2000

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002525

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Mercuri, Lucildes Pita
M556e Estudo termoanalítico e caracterização química de cálculos biliares e bile humana / Lucildes Pita Mercuri. -- São Paulo, 2000.
190p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Matos, Jivaldo do Rosário
Co-orientador: Cirino, Luis Marcelo Inaco

1. Métodos térmicos : Química analítica I. T. II. Matos, Jivaldo do Rosário, orientador III. Cirino, Luis Marcelo Inaco, co-orientador.

543.086 CDD

"Estudo Termoanalítico e Caracterização Química de Cálculos Biliares e Bile Humana".

LUCILDES PITA MERCURI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Prof. Dr. LUIS MARCELO INACO CIRINO
IQ - USP
(Co-Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PAULO ROBERTO BUENO PEREIRA
FM - USP

Prof. Dr. GILBERTO ORIVALDO CHIERICI
IQSC - USP

Prof. Dr. ANTÔNIO GOUVEIA DE SOUZA
UFPB

Prof. Dr. LÁZARO MOSCARDINI D'ASSUNÇÃO
EFOA

SÃO PAULO
02 DE FEVEREIRO DE 2000.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

A Deus,

Por conceder-me saúde, luz, serenidade, humildade, força, equilíbrio e amor. E ensinar-me que o impossível não existe para aqueles que têm a Fé e o Amor no coração.

Obrigada Pai de Amor e Bondade por caminhar ao meu lado segurando às minhas mãos.

À minha alma gêmea, Jivaldo,

Agradeço o carinho, paciência, atenção, incentivo, amor e dedicação proporcionados nas horas mais críticas e nos momentos difíceis dessa jornada.

Para ti, dedico todo o amor e a felicidade imensurável que me invade na finalização deste trabalho. Esse momento de realização, não é meu e sim nosso.

A você dedico o meu amor eterno.

Aos meus avós, Laura e Manoel (in memoriam), que me ensinaram a importância de amar e lutar com dignidade pela realização de um ideal.

Amo vocês com todo o meu espírito e minha alma.

Aos meus pais. Jucildes e Luiz, pelo bem preciosíssimo da vida e, pela conscientização da importância do aprendizado para o meu crescimento pessoal e profissional.

A vocês meu amor, admiração e gratidão eterna.

Aos meus irmãos, Cláudia e Luiz, e tios, Daniel, Silvanira, Maria Rita, Laura, Amélia e Maria Helena, pelo carinho e ajuda moral.

Amo todos vocês!

A Linnus e/ou Laura, que já
habitam no meu coração, dedico
especialmente esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela oportunidade oferecida para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos pela valiosa e sábia orientação, carinho, amizade, oportunidade e confiança na realização deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Marcelo Inaco Cirino pela competente e segura co-orientação e, pela satisfação de tê-lo como amigo.

Aos Professores doutores, Erasmo Tolosa, Nelson F. Margarido e a Comissão de ética do Hospital Universitário pela liberação e apoio a este trabalho.

Às equipes de cirurgiões, enfermeiros, auxiliares e todos que fazem parte do centro cirúrgico e da secretaria de cirurgia do HU, meus sinceros agradecimentos pela valiosa colaboração durante todo o período de coleta dos materiais.

Ao Sr(a) Assessor(a) pela colaboração durante a execução deste trabalho.

Aos funcionários da Central Analítica do Instituto de Química da USP, pela colaboração nos resultados de análise elementar.

Ao MSc. Flávio Machado de Souza Carvalho, funcionário do Laboratório de Difração de raio X do departamento de Minerologia e Geotectônica do Instituto de Geociências da USP, pela obtenção e interpretação dos difratogramas de raios X, o nosso sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Frank H. Quina pelo uso do liofilizador pertencente ao seu laboratório e, também, ao seu grupo de pesquisa: Paulo Firmino, Flávio, Celise, Adilson e Chang, pela orientação e uso dessa instrumentação.

Ao colega e amigo Mery dos Santos Filho, pesquisador da Oxiteno S/A Industria e Comércio, pela obtenção e valiosa discussão dos espectros de absorção na região do infravermelho, o nosso sincero agradecimento.

Aos colegas do LATIG, pela convivência, amizade e companheirismo.

Aos colegas Arnaud e Renato pelo apoio e ajuda durante o período de coletas dos materiais para o IQ-USP.

Ao Prof. Dr. Waldir Ferreira pelo incentivo e amizade.

Aos funcionários da Xerox do IQ-USP, Francisco e Jaílton, que com simpatia e dedicação muito nos ajudaram na reprodução da impressão do trabalho.

À SINC do Brasil, pelo apoio técnico.

À FAPESP pelos auxílios concedidos, processos nºs 1995/5909/7 e 1996/11774-0.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Pág.

LISTA DE FIGURAS i

LISTA DE TABELAS Xiii

RESUMO Xv

ABSTRACT Xvi

Capítulo I

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 01

Capítulo II

II. CONSIDERAÇÕES GERAIS 03

II.1. LITÍASE BILIAR 03

II.2. ANÁLISE TÉRMICA 25

II.2.1. Histórico 25

II.2.2. Termogravimetria /Termogravimetria Derivada (TG/DTG) 26

II.2.3. Análise Térmica Diferencial (DTA) 29

II.2.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) 30

II.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA 34

II.3.1. Análise Elementar (A.E) 34

II.3.2. Espectroscopía de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 35

II.3.3. Difratometria de Raios X 43

Capítulo III

III.1.MATERIAL E MÉTODOS 48

III.1.1. Matérias Primas 48

III.1.2. Reagentes 49

III.1.2.1. Padrões 49
III.1.2.2. Sintetizado 49
III.2. MÉTODOS 50
III.2.1. Metodologia de Amostragem 50
III.2.2. Metodologia para o Pré-Tratamento das Amostras 50
III.2.2.1. Cálculos Biliares 50
III.2.2.2. Bile 51
III.2.3. Métodos de Análises 51
III.2.3.1. Caracterização Química 51
III.2.3.1.1. Análise Elementar (A.E.) 51
III.2.3.1.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 52
III.2.3.1.3. Difratometria de Raios X 52
III.2.3.2. Estudo Termoanalítico 52
III.2.3.2.1. Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG) 53
III.2.3.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) 54

Capítulo IV

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
IV.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA 57
IV.1.1. Aspectos Gerais sobre as Amostras de Cálculos Biliares e Bile 57
IV.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA 60
IV.2.1. Análise Elemenatar (A.E) 60
IV.2.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 63
IV.2.2.1. COMPOSTOS PADRÕES QUE FAZEM PARTE DO PROCESSO METABÓLICO BILIAR 64
IV.2.2.2. AMOSTRAS DE CÁLCULOS BILIARES E BILE QUE FAZEM PARTE DA NOVA CLASSIFICAÇÃO BILIAR 79
IV.2.3. Difração de Raios X 93
IV.3. ESTUDO TERMOANALÍTICO 104

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura I.1-	Fluxograma de trabalho	2
Figura II.1-	Evolução e complicações da colelitíase	5
Figura II.2-	Conversão da hemoglobina à bilirrubina	8
Figura II.3-	Metabolismo do pigmento biliar normal	9
Figura II.4-	Metabolismo dos ácidos biliares	11
Figura II.5-	Curva de solubilidade do colesterol	13
Figura II.6-	Diagrama de Venn das deficiências necessárias para cristalizar colesterol na bile, em uma escala de tempo acelerada	18
Figura II.7-	Esquema proposto para a patogenia dos cálculos pigmentar preto	20
Figura II.8-	Esquema proposto para a patogenia do cálculo pigmentar marron nos ductos biliares humanos	23
Figura II.9-	Curvas TG/DTG do padrão de colesterol, obtidas na termobalança, TGA-50, sob atmosfera dinâmica de ar e razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}	28
Figura II.10-	Curva DTA obtida sob atmosfera dinâmica de He e razão de aquecimento de 40 °C min^{-1} de uma amostra de $La(C_7H_7SO_3)_3.2H_2O$	30
Figura II.11-	Curva DSC do padrão de colesterol, obtida na célula DSC de fluxo de calor, sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C min^{-1}	33
Figura II.12-	Curva DSC do padrão de colesterol, obtida na célula DSC de compensação de potência, sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C min^{-1}	33
Figura II.13-	Esquema do processo de determinação de carbono, hidrogênio e nitrogênio por análise elementar	34
Figura II.14-	Vibrações de estiramento e deformações	37

Figura II.15- Vibrações e absorções do grupo hidroxílico alcoólico..... 41

Figura II.16- Espectro de absorção na região do infravermelho de uma amostra padrão de colesterol..... 42

Figura II.17- Representação gráfica da lei de Bragg 45

Figura II.18- Esquema de um difratômetro do tipo Bragg e Brentano..... 46

Figura II.19- Difratograma de raios X do padrão de colesterol obtido pelo método do pó..... 47

Figura III.1- Técnicas utilizadas na caracterização do material em estudo com suas respectivas finalidades..... 55

Figura III.2- Instrumentação analítica utilizada no processo de caracterização do material..... 56

Figura IV.1- Representação fotográfica dos cálculos biliares pertencentes ao grupo A com colorações distintas..... 57

Figura IV.2- Representação fotográfica de um cálculo biliar com 37 mm de comprimento..... 59

Figura IV.3- Representação fotográfica das amostras de bile liofilizadas, pertencentes ao grupo A..... 59

Figura IV.4- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão de colesterol..... 64

Figura IV.5- Fórmula estrutural plana do colesterol..... 65

Figura IV.6- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido cólico..... 66

Figura IV.7- Fórmula estrutural plana do ácido cólico..... 67

Figura IV.8- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido deoxicólico..... 67

Figura IV.9- Fórmula estrutural plana do ácido deoxicólico..... 68

Figura IV.10- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido quenodeoxicólico..... 69

Figura IV.11- Fórmula estrutural plana do ácido quenodeoxicólico..... 70

Figura IV.12- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido litocólico..... 70

Figura IV.13- Fórmula estrutural plana do ácido litocólico..... 71

Figura IV.14- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do éster metílico de ácido cólico..... 72

Figura IV.15- Fórmula estrutural plana do éster metílico de ácido cólico.... 73

Figura IV.16- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão dos sais biliares..... 73

Figura IV.17- Fórmula estrutural plana do colato de sódio..... 74

Figura IV.18- Fórmula estrutural plana do deoxicolato de sódio..... 75

Figura IV.19- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão da bilirrubina..... 75

Figura IV.20- Fórmula estrutural plana da bilirrubina..... 76

Figura IV.21- Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do bilirrubinato de cálcio..... 77

Figura IV.22- Fórmula estrutural plana do bilirrubinato de cálcio..... 78

Figura IV.23- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF16 e bile BF16, pertencente ao grupo A..... 80

Figura IV.24- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculos biliares SF16 e SF8, pertencentes ao grupo A, que apresentaram teores de nitrogênio distintos via análise elementar, ou seja, 0,42 e 0,18%, respectivamente..... 80

Figura IV.25- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF17 e bile BF17, pertencente ao grupo B..... 81

Figura IV.26- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SM58 e bile BM58, pertencente ao grupo C. 82

Figura IV.27- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SM31 e bile BM31, pertencente ao grupo D..... 83

Figura IV.28- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF54 e bile BF54, pertencente ao grupo E..... 84

Figura IV.29- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF47 e bile BF47, pertencente ao grupo F. 85

Figura IV.30- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SM44 e bile BM44, pertencente ao grupo G..... 86

Figura IV.31- Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF15 e bile BF15, pertencente ao grupo H..... 87

Figura IV.32 Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras dos cálculos biliares, pertencentes aos grupos A, B, C, e D..... 89

Figura IV.33- Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculos biliares, pertencentes aos grupos E, F, G e H..... 90

Figura IV.34- Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de bile, pertencentes aos grupos A, B, C, e D..... 91

Figura IV.35- Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de bile, pertencentes aos grupos E, F, G e H..... 92

Figura IV.36- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF16, pertencente ao grupo A, obtido utilizando o método do pó..... 95

Figura IV.37- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF17, pertencente ao grupo B, obtido utilizando o método do pó..... 96

Figura IV.38- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SM58, pertencente ao grupo C, obtido utilizando o método do pó..... 97

Figura IV.39- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SM31, pertencente ao grupo D, obtido utilizando o método do pó..... 98

Figura IV.40- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF54, pertencente ao grupo E ,obtido utilizando o método do pó... 99

Figura IV.41- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF47, pertencente ao grupo F, obtido utilizando o método do pó... 100

Figura IV.42- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SM44, pertencente ao grupo G, obtido utilizando o método do pó..... 101

Figura IV.43- Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF15, pertencente ao grupo H, obtido utilizando o método do pó. 102

Figura IV.44- Sobreposição dos difratogramas de raios X das amostras de cálculos biliares, pertencente aos grupos A, B, C, D, E, F, G e H, obtidos utilizando o método do pó..... 103

Figura IV.45- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do colesterol..... 106

Figura IV.46- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido cólico..... 107

Figura IV.47- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido deoxicólico..... 108

Figura IV.48- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido quenodeoxicólico. 109

Figura IV.49- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido litocólico..... 111

Figura IV.50- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do éster metílico de ácido cólico. 112

Figura IV.51- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão dos sais biliares..... 114

Figura IV.52- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão da bilirrubina. 115

Figura IV.53- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do bilirrubinato de cálcio..... 117

Figura IV.54- Sobreposição das curvas TG dos padrões que fazem parte do processo metabólico dos pigmentos biliares..... 118

Figura IV.55- Sobreposição das curvas DSC dos padrões que fazem parte do processo metabólico dos pigmentos biliares..... 118

Figura IV.56- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF16, pertencente ao grupo A 121

Figura IV.57- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar BF16, pertencente ao grupo A..... 121

Figura IV.58- Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SF16 e bile BF16, pertencentes ao grupo A..... 122

Figura IV.59- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo Biliar SF3..... 159

Figura IV.60- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF3..... 159

Figura IV.61- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo Biliar SF4..... 160

Figura IV.62- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF4..... 160

Figura IV.63- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF7..... 161

Figura IV.64- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF7..... 161

Figura IV.65- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF8..... 162

Figura IV.66- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF8..... 162

Figura IV.67- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF9 163

Figura IV.68- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF9 163

Figura IV.69- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM10 164

Figura IV.70- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM10 164

Figura IV.71- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF12 165

Figura IV.72- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF12 165

Figura IV.73- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM13 166

Figura IV.74- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM13 166

Figura IV.75- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF14 167

Figura IV.76- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF14 167

Figura IV.77- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM18 168

Figura IV.78- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM18 168

Figura IV.79- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF26 169

Figura IV.80- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF26 169

Figura IV.81- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF27 170

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Figura IV.82- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF27 170

Figura IV.83- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF32 171

Figura IV.84- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF32 171

Figura IV.85- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF36 172

Figura IV.86- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF36 172

Figura IV.87- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF40 173

Figura IV.88- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar BF40 173

Figura IV.89- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF41 174

Figura IV.90- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF41 174

Figura IV.91- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF45 175

Figura IV.92- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF45 175

Figura IV.93- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF46 176

Figura IV.94- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF46 176

Figura IV.95- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF50 177

Figura IV.96- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF50 177

Figura IV.97- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF53 178

Figura IV.98- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF53 178

Figura IV.99- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF55 179

Figura IV.100- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF55 179

Figura IV.101- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF57 180

Figura IV.102- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF57 180

Figura IV.103- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF17, pertencente ao grupo B 128

Figura IV.104- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BF17, pertencente ao grupo B 128

Figura IV.105- Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SF17 e bile BF17, pertencentes ao grupo B 129

Figura IV.106- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF1 181

Figura IV.107- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF1 181

Figura IV.108- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF5 182

Figura IV.109- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF5 182

Figura IV.110- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM22 183

Figura IV.111- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM22 183

Figura IV.112- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF25 184

Figura IV.113- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF25 184

Figura IV.114- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF35 185

Figura IV.115- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF35 185

Figura IV.116- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM51 186

Figura IV.117- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM51 186

Figura IV.118- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SM58, pertencente ao grupo C 131

Figura IV.119- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BF17, pertencente ao grupo B 131

Figura IV.120- Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SM58 e bile BM58, pertencentes ao grupo B 132

Figura IV.121- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra cálculo biliar SF37 187

Figura IV.122- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF37 187

Figura IV.123- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF59 188

Figura IV.124- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF59 188

Figura IV.125- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SM31, pertencente ao grupo D 133

Figura IV.126- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BM31, pertencente ao grupo D 134

Figura IV.127 Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SM31 e bile BM31, pertencentes ao grupo D..... 134

Figura IV.128- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de Cálculo biliar SM56..... 189

Figura IV.129- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BM56..... 190

Figura IV.130- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF54, pertencente ao grupo E 135

Figura IV.131- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BF54, pertencente ao grupo E..... 135

Figura IV.132- Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SF54 e bile BF54, pertencentes ao grupo E..... 136

Figura IV.133- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF47, pertencente ao grupo F 136

Figura IV.134- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BF47, pertencente ao grupo F..... 137

Figura IV.135- Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SF47 e bile BF47, pertencentes ao grupo F..... 137

Figura IV.136- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo Biliar SM43..... 190

Figura IV.137- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM43..... 190

Figura IV.138- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SM44, pertencente ao grupo G 138

Figura IV.139- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BM44, pertencente ao grupo G..... 138

Figura IV.140- Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SM44 e bile BM44, pertencentes ao grupo G..... 139

Figura IV.141- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF15, pertencente ao grupo H 140

Figura IV.142- Curvas TG/DTG da amostra SF17 obtidas sob atmosfera mista de ar + CO_2, submetida a uma programação de aquecimento a 10 °C min^{-1} da temperatura ambiente até 1200°C, e uma de resfriamento a -10 °C min^{-1}, até 500°C..... 141

Figura IV.143- Sobreposição das curvas TG da amostra de SF15, padrão de $CaCO_3$, de colesterol e de bilirrubinato de cálcio..... 141

Figura IV.144- Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BF15, pertencente ao grupo H..... 142

Figura IV.145- Sobreposição das curvas DSC das amostras de cálculo biliar SF15 e bile BF15, pertencentes ao grupo H..... 143

LISTA DE TABELAS

		Pág
Tabela II.1	Colelitíase: Escolhas terapêuticas	6
Tabela II.2	Composição média da bile da vesícula humana (grama/decilítro)	10
Tabela II.3	Classificação dos cálculos biliares	16
Tabela II.4	Características dos cálculos pigmentares "Preto x Marron"	17
Tabela II.5	Comparação dos valores teóricos de carbono e hidrogênio com os experimentais, obtidos pela análise elementar...	35
Tabela III.1	Interpretação dos códigos das amostras coletadas de cálculos biliares de bile humana	48
Tabela III.2	Compostos padrões com a respectiva composição, fórmula molecular e percentagem de pureza	49
Tabela IV.1	Aspectos físicos das amostras de cálculos biliares e bile, idade dos pacientes e incidência dos cálculos biliares nos grupos	58
Tabela IV.2	Resultados de análise elementar (CHN) das amostras de cálculos biliares	61
Tabela IV.3	Resultados de análise elementar (CHN) das amostras de bile.	62
Tabela IV.4	Resultados de análise elementar (CHN) dos padrões dos sais e ácidos biliares, que fazem parte do processo metabólico biliar	63
Tabela IV.5	Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de colesterol e suas atribuições	65
Tabela IV.6	Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de ácido cólico e suas atribuições	66
Tabela IV.7	Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de ácido deoxicólico e suas atribuições	68

Tabela IV.8 Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de ácido quenodeoxicólico e suas atribuições..... 69

Tabela IV.9 Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de ácido litocólico e suas atribuições..... 71

Tabela IV.10 Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão do éster metílico do ácido cólico e suas atribuições..... 72

Tabela IV.11 Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão dos sais biliares e suas atribuições..... 74

Tabela IV.12 Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de bilirrubina e suas atribuições..... 76

Tabela IV.13 Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de birrubinato de cálcio e suas atribuições..... 78

Tabela IV.14 Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição dos padrões, obtidos através das curvas TG/DTG..... 117

Tabela IV.15 Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição das amostras de cálculos biliares, pertencentes aos grupos A a H, obtidos através das curvas TG/DTG 123

Tabela IV.16 Dados de temperatura (T_{onset}), temperatura do pico (T_{pico}) e entalpia de fusão (ΔH_s^j), obtidos das curvas DSC..... 124

Tabela IV.17 Composição da amostra SF17 e teores de C, H e N calculados a partir dos dados de termogravimetria..... 127

"Estudo Termoanalítico e Caracterização Química de Cálculos Biliares e Bile Humana"

RESUMO

RESUMO

Este trabalho consiste na caracterização química e termoanalítica da composição química de cálculos biliares e bile humana, coletados da vesícula biliar de pacientes que foram submetidos à colecistectomia no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

As metodologias utilizadas para amostragem, caracterização química e termoanalítica foram previamente otimizadas por um estudo preliminar, trabalhando-se com um total de 38 amostras de cálculos biliares e bile da vesícula biliar humana.

A técnica de análise elementar para a determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi usada para a caracterização química junto com a espectroscopia de absorção na região do infravermelho e difração de raios X. Esses resultados foram complementados por dados obtidos pelas técnicas termoanalíticas TG/DTG e DSC.

O estudo do comportamento térmico foi realizado empregando as técnicas TG/DTG em atmosfera dinâmica de ar e razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}. No caso da amostra de cálculo biliar SF15, considerada atípica por apresentar um teor de 81% de $CaCO_3$ na sua composição química, utilizou-se atmosfera mista de ar+CO_2. Em todos os ensaios foram empregados. Os eventos térmicos (físicos e químicos) foram evidenciados pelas curvas DSC, por picos no sentido endotérmicos e exotérmicos.

A comparação dos perfis das curvas TG/DTG e os resultados de perdas de massa evidenciaram junto com os teores de CHN obtidos por análise elementar, possibilitaram 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 a elaboração de uma nova classificação para os cálculos biliares da vesícula biliar humana baseado na sua composição química.

"Thermal Analysis Study and Chemical Caracterization of Human Gallstone and Bile"

ABSTRACT

ABSTRACT

This work consists of the chemical characterization and thermoanalytical of the chemical composition of gallstones and human bile, collected of the gallbladder of patients that were submitted to cholecystectomy at University Hospital of São Paulo University.

The methodologies used to sampling, chemical characterization and thermoanalytical were previously optimized for a preliminary study, working with a total of 38 gallstones and human bile samples.

For chemical characterization elementary analysis techniques, to carbon, hydrogen and nitrogen determination, infrared spectroscopy and X-rays diffraction were used, these results complemented the obtained thermoanalytical data for TG/DTG and DSC techniques .

The gallstones and bile samples thermal behavior study was accomplished using the techniques TG/DTG in dynamic air atmosphere. In the case gallstone SF15 sample, considered like abnormal due to its content of 81% of $CaCO_3$ in its chemical composition. For this one, a mixture air + CO_2 was used. In all experiments were used heating rate of 10 °C min^{-1}. The thermal events (physical and chemical) were evidenced by the DSC curves, with endothermic and exothermic peaks.

By means of the comparison TG/DTG curves profiles, the results of mass losses for them evidenced, with CHN's contents obtained for elementary analysis, they can classify the gallstones in eight distinct groups (A, B, C, D, E, F, G and H). The DSC curves, infrared spectra and X-rays diffraction, they confirmed the chemical composition distinction of these groups. Thus, it was possible the elaboration of a new classification for the gallstones formatted in the human gallbladder based in your chemical composition.

Introdução e Objetivos

CAPÍTULO I

- Introdução

e

- Objetivos

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Esse estudo relata a caracterização química e termoanalítica de cálculos biliares e bile humana, de grande importância no âmbito científico, pois acredita-se que, ao conhecer a composição química desses materiais biológicos, será possível entender o equilíbrio químico que ocorre no processo metabólico biliar e esclarecer o porquê da formação de cálculos na vesícula biliar. Com isso, certamente, a colelitíase que desde 1924 vem preocupando a comunidade científica, principalmente a gastroenterológica e a epidemiológica, deixará de ser considerada uma enfermidade frequente na população. vem se preocupando em esclarecer a incidência dessa afecção que atinge uma grande parte da população mundial.

Vários estudos sobre a litíase biliar foram realizados, mas poucos trabalhos que envolvem a caracterização química de cálculos biliares e bile, obtida a partir das diferentes técnicas analíticas. Há, portanto, muitos pontos a serem revistos e esclarecidos sobre essa enfermidade. Com base nesse relato, este trabalho tem como objetivo geral colaborar para o estudo dessa anomalia, conhecendo, para isso, a composição química dos seus produtos, cálculos biliares e bile. Como objetivos específicos, propomo-nos a: 1) otimizar uma metodologia de amostragem para esse material; 2) caracterizar quimicamente os cálculos biliares e a bile, utilizando a análise elementar (A.E.); espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios X (DRX); 3) estudar termoanalíticamente as matrizes propostas, a partir da termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) e da calorimetria exploratória diferencial (DSC); 4) e, finalmente, buscar a correlação entre os dados de caracterização química e termoanalítica, visando um conhecimento mais aprimorado da formação e, se possível, propor uma nova classificação da composição dos produtos dessa patogenia.

Para direcionar e facilitar o desenvolvimento desse trabalho foi elaborado um fluxograma com todas as etapas e sequências dessa proposta, Figura I.1.

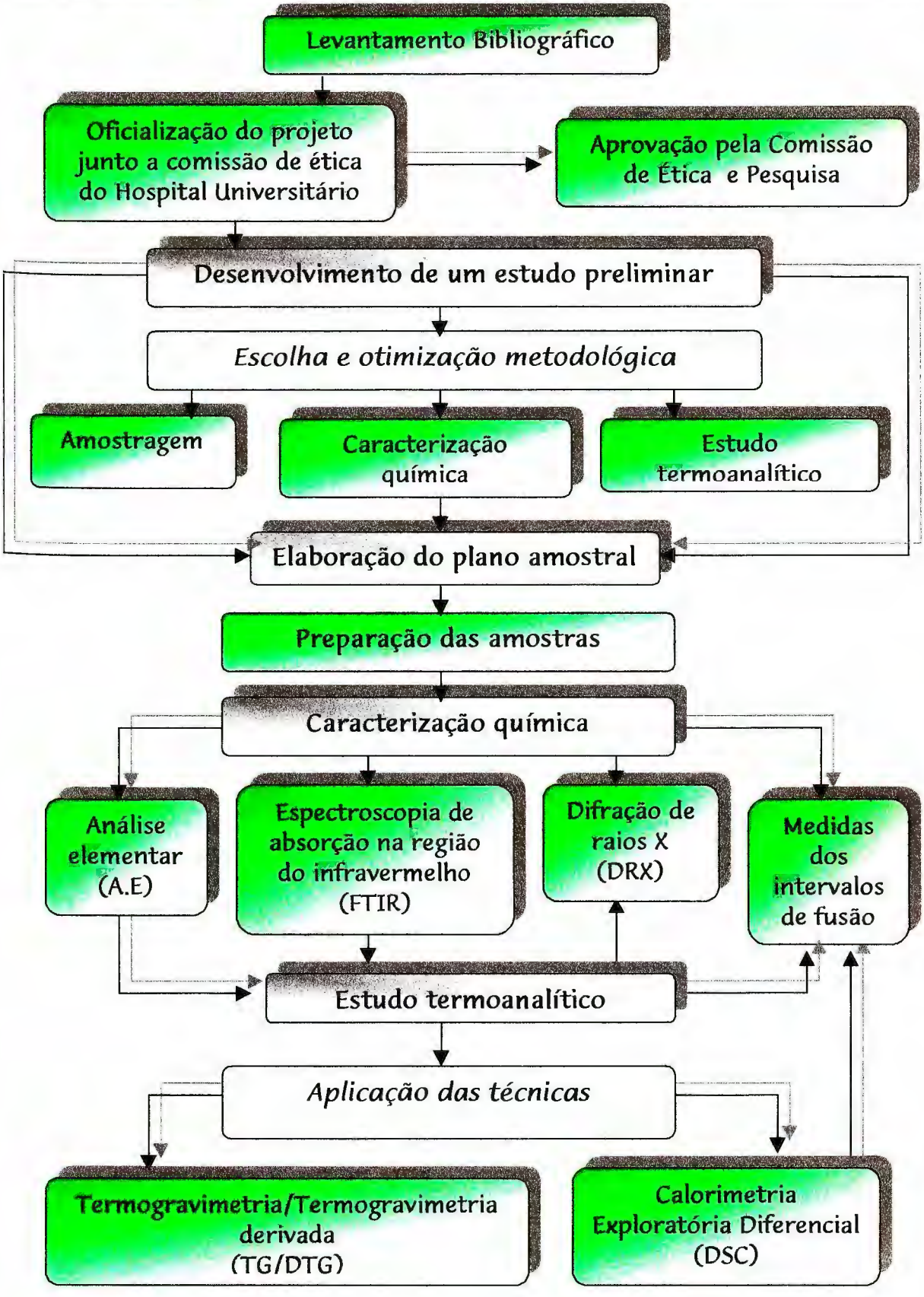

Figura I.1 - Fluxograma de trabalho.

CAPÍTULO II

Considerações gerais sobre os seguintes tópicos:

- Litíase Biliar.
- Análise Térmica.
- Técnicas utilizadas para a Caracterização Química

II. CONSIDERAÇÕES GERAIS

II.1. LITÍASE BILIAR

A litíase biliar ou colelitíase é caracterizada pela presença de concreções na vesícula biliar ou nos ductos biliares (STEDMAN, 1996). Essa anormalidade constitui uma das alterações mais freqüentes da árvore biliar e, por isso, a pesquisa científica tem feito esforços para esclarecer essa afecção, principalmente com relação aos cálculos de colesterol, mais comumente encontrados.

Estudos epidemiológicos referem que a incidência da litíase biliar na população é conhecida. No entanto a maioria dos estudos, até agora realizados, foram feitos com material de necropsia, os quais dificultam dados de associação. Com isso, observou-se que a prevalência da calculose biliar é alta na Escandinávia, baixa no Japão e praticamente nula nas tribos dos Masai na África (RAIA & ZERBINI, 1988).

Com efeito, estudos realizados com os índios Pima do Arizona permitem concluir-se, pelos exames colecistográficos, que nessa população indígena 70% das mulheres, com idade aproximada de 30 anos, apresentam litíase biliar, enquanto 70% dos homens eram portadores dessa afecção aos 60 anos (SAMPLINER *et alii*, 1970). Entretanto Bennett e colaboradores não conseguiram estabelecer uma correlação positiva entre doenças do cálculo biliar e outros fatores tais como: obesidade, diabetes, níveis de colesterol no soro, arteriosclerose e paridade, observados durante o estudo dessa tribo. Todavia acredita-se que em mulheres e obesas aumenta a chance do desenvolvimento dos cálculos biliares (BOCKUS, 1985).

Nos EUA, anualmente, são efetuadas cerca de 800.000 a 1.000.000 colecistectomias, o que atesta a alta prevalência dessa afecção naquele país.

No Brasil, Rocha realizou no Triângulo Mineiro o primeiro trabalho sobre a incidência de colelitíase (ROCHA, 1977).

Em 1980, Nakaie estudou tal incidência no município de São Paulo, utilizando amostras de um total de 984 autópsias 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).

Existem três estágios clínicos da colelitíase: assintomático, sintomático e complicado. As formas complicadas da colelitíase incluem tanto a colelitíase aguda quanto a coledocolitíase, além das complicações ocasionadas por ambas. Alguns estudos relatam que o câncer vesicular está, também, associado com a colelitíase (STRASBERG & CLAVIEN, 1993).

Não se conhecem as razões porque, em alguns casos, a colelitíase pode evoluir assintomaticamente, enquanto, em outros, apresenta sintomas e complicações. Os cálculos localizados na vesícula biliar provocam poucos sintomas, que surgem quando da mobilização dos mesmos ocasionando obstrução do ducto cístico ou do hepatocolédoco (RAIA & ZERBINI, 1988).

A cólica biliar é a manifestação mais comum da colelitíase. Surge em decorrência de obstrução do ducto cístico ou do hepatocolédoco e é a causa primária da colecistite aguda (RAIA & ZERBINI, 1988).

A grande maioria dos autores concordam com o fato de que a colelitíase sintomática, se não submetida à cirurgia, produz em metade dos casos obstrução do colédoco e várias complicações da doença (Figura II.1), necessitando de cirurgia dentro de um período de cinco anos após o quadro clínico inicial (RAIA & ZERBINI, 1988).

A proporção anual de conversão da colelitíase assintomática para sintomática é de 1 a 4% (THISTLE *et alii*, 1984).

Há uma pequena evidência de que a administração de algum tratamento é justificado para a profilaxia da colecistolitíase, com exceção da vesícula calcificada, que deverá ser removida por causa do risco de malignidade que excede 25% (POLK, 1966).

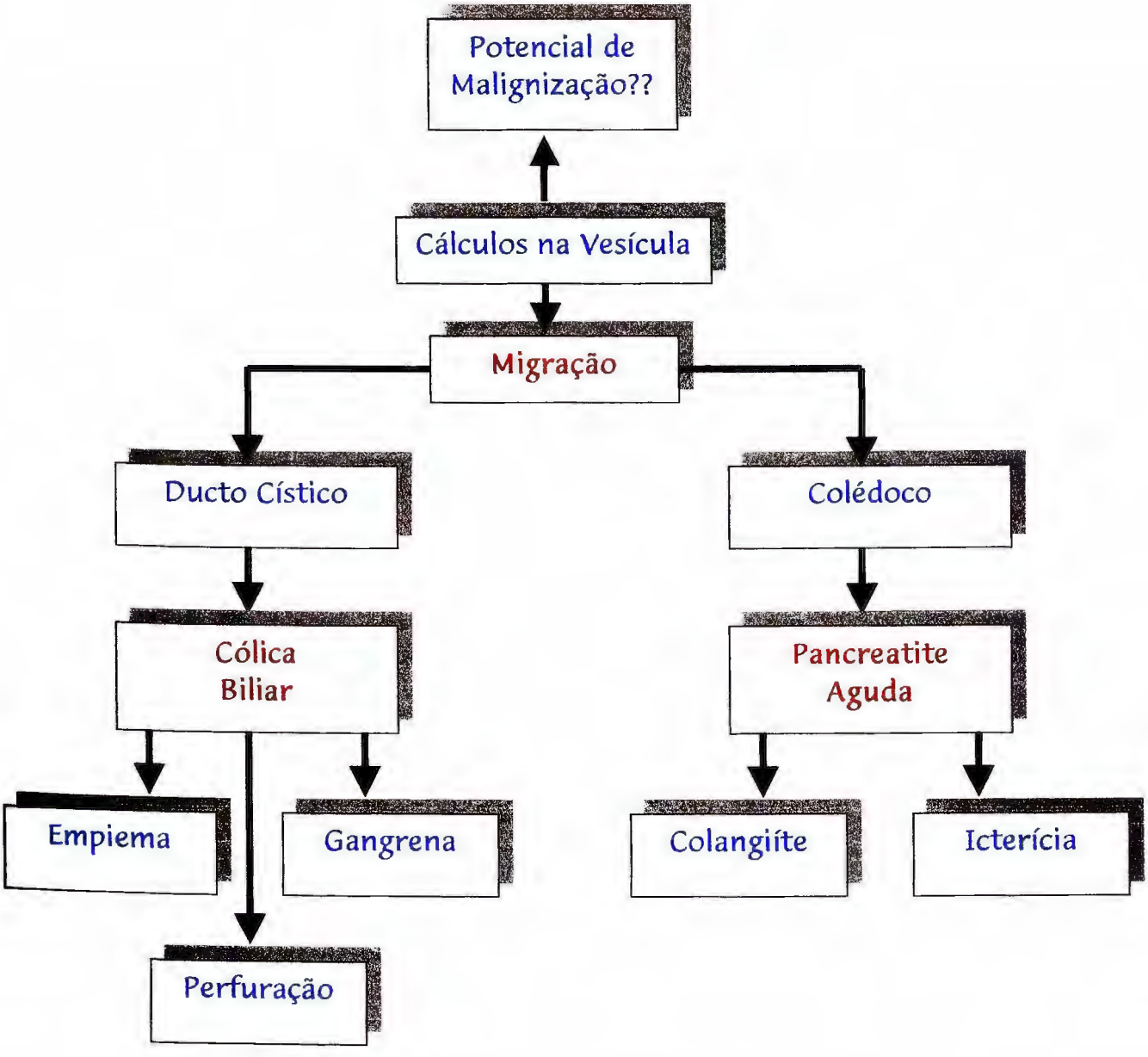

Figura II.1 - Evolução e complicações da colelitíase

Pacientes sintomáticos são tratados para evitar recorrentes dores biliares e complicações. Muitos tratamentos são avaliados. A escolha terapêutica faz-se entre apenas a eliminação dos cálculos, ou a eliminação dos cálculos e da vesícula biliar. Os vários tratamentos podem ser classificados em uma das categorias listadas na Tabela II.1 (STRASBERG & CLAVIEN, 1993).

Tabela II.1 - Colelitíase: Escolhas terapêuticas

<table>
<tr><th>ELIMINAÇÃO DE CÁLCULOS BILIARES</th><th>ELIMINAÇÃO DE CÁLCULOS BILIARES E DA VESÍCULA BILIAR</th></tr>
<tr><td>Terapia dos ácidos biliares via oral</td><td rowspan="2">Colecistectomia clássica:
◣ Incisão padrão;
◣ Mini incisão</td></tr>
<tr><td>Ondas de choque extracorporal
Litotripsia</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Terapia de contato:
◣ Dissolução com solvente (MTBE= metil terc-butil éter);
◣ Agitação mecânica e extração de cálculos por caminho percutâneo (Picus et alii, 1992).</td><td>Colecistectomia Laparoscópica</td></tr>
</table>

Para melhor compreensão sobre a formação dos cálculos biliares é conveniente uma discussão mais detalhada sobre o metabolismo dos pigmentos biliares. Pode-se dizer que a bilirrubina IX-α (não conjugada) é um pigmento biliar de estrutura tetrapirrolíca de cadeia aberta, constituída de dois grupamentos de ácido propiônico (BONNETT *et alii*, 1976), formado a partir da hemoglobina e, por menor extensão, pelo colapso da mioglobina [proteína transportadora de oxigênio do músculo (STEDMAN, 1996)] e síntese hepática. Quando as

hemácias são destruídas pelo sistema retículoendotelial, durante o final da vida natural ou prematura, o ferro e a globina [proteína da hemoglobina (STEDMAN, 1996)] são removidas, e o anel da hemoglobina é aberto e transformado em biliverdina, que é verde. O último é reduzido tornando-se bilirrubina, que é amarela, Figura II.2 (SCHWARTZ *et alii*, 1982). A captação da bilirrubina, pelo hepatócito, envolve uma série de mecanismos incertos, porém é sabido que se despreende da albumina, ligando-se, dentro da célula hepática, à ligandina (proteína Y) e em menor proporção à proteína Z. A ligandina (glutation S-transferase-B) é uma proteína solúvel, que representa 5% das proteínas solúveis do fígado humano. A afinidade de ligação da ligandina para a bilirrubina é aproximadamente cinco vezes maior do que à da albumina. Esse fato associado a possível perda de afinidade entre bilirrubina e albumina, quando do contato do complexo albumina-bilirrubina com a superfície do hepatócito, poderia explicar a captação da bilirrubina pela célula hepática (RAIA & ZERBINI, 1988).

De fato, existem diversas evidências que apontam para um sistema de transporte, mediado por carregador, como responsável pela captação hepática da bilirrubina e de outros ânions inorgânicos. A proteína Z (proteína de ligação de ácidos graxos) mesmo apresentando menor afinidade de ligação com a bilirrubina, do que a ligandina, apresenta maior capacidade de ligar-se com a bilirrubina. Contudo tal ligação ocorre somente após saturação da ligandina presente (RAIA & ZERBINI, 1988).

Dentro do hepatócito, no retículo endoplasmático liso, a bilirrubina IX-α livre sofre conjugação com o ácido glicurônico, pela ação do sistema enzimático UDP-glicuronil transferase, dando origem à bilirrubina conjugada ou glicuronato de bilirrubina solúvel em água. A conjugação da bilirrubina IX-α ocorre nas cadeias laterais de ácido propiônico e é um processo obrigatório para a posterior excreção da bilirrubina na bile. A bilirrubina conjugada pode ser monoglicuronato (conjugação apenas numa cadeia de ácido propiônico) ou diglicuronato (conjugação nas duas cadeias). Na bile humana predomina diglicuronato de bilirrubina (80%) (RAIA & ZERBINI, 1988).

Uma vez conjugada a bilirrubina é rapidamente excretada através das microvilosidades do canalículo do hepatócito, sendo eliminada na bile sob a forma de um complexo micelar com sais biliares, fosfolipídeos e colesterol. Chegando ao trato intestinal é desconjugada pela ação de β-glicuronidases de origem bacteriana (principalmente no íleo terminal e intestino grosso), e reduzida para urobilinogênio. Diariamente 100 a 200 mg de urobilinogênio são excretadas nas fezes, e uma pequena quantidade é reabsorvida, sendo reexcretada pelo fígado ou eliminada na urina (circuito êntero-hepático), Figura II.3, (RAIA & ZERBINI, 1988).

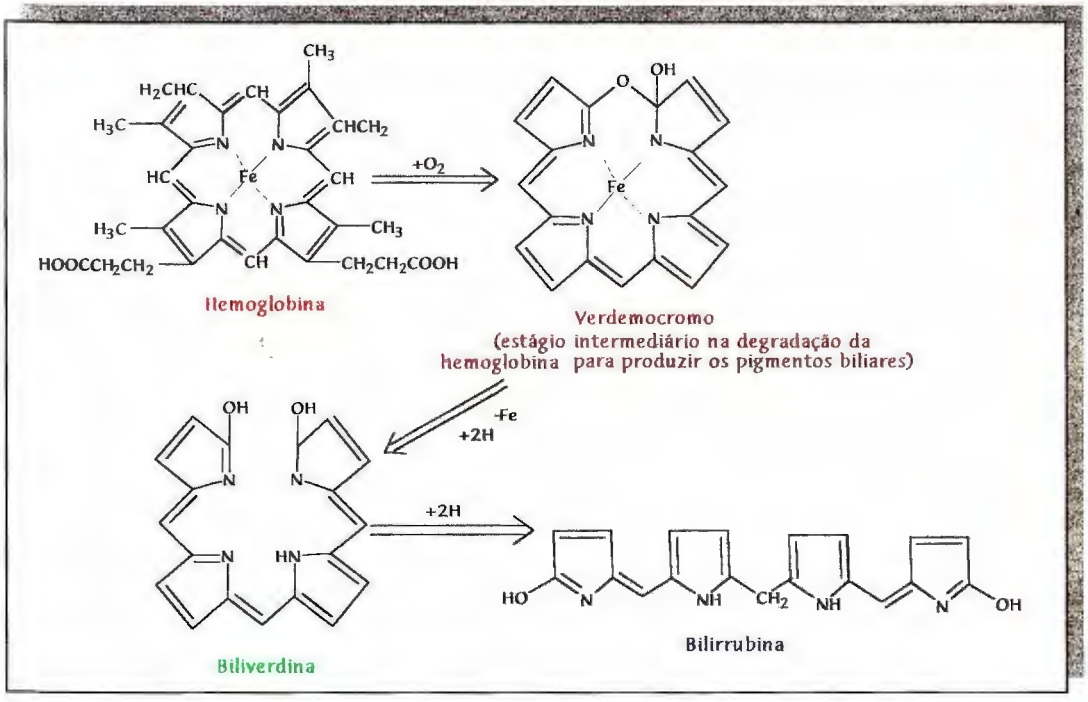

Figura II.2 - Conversão da hemoglobina à bilirrubina

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

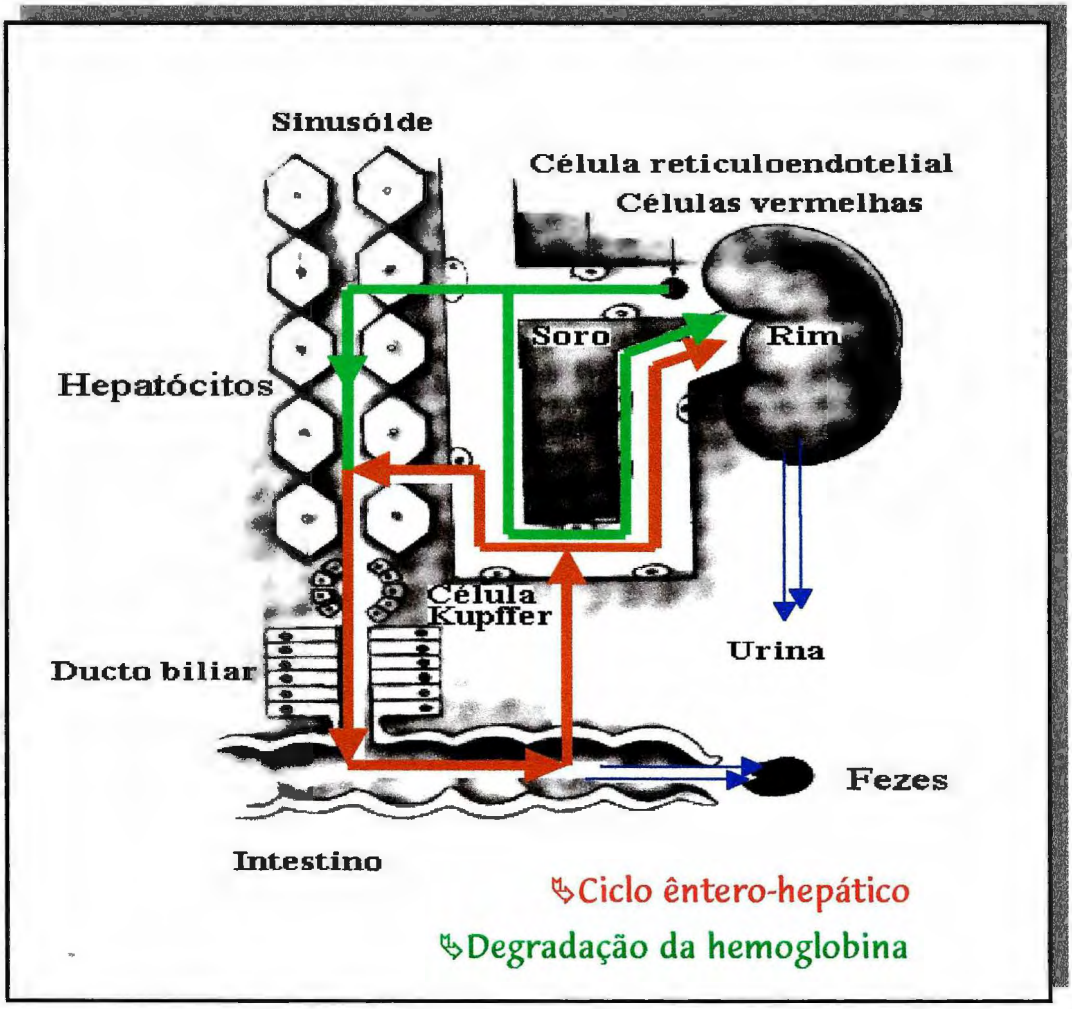

Figura II.3 - Metabolismo do pigmento biliar normal.

Normalmente a bile, um líquido isotônico alcalino (pH ≅ 7.8), é uma mistura de hepatócitos e das células epiteliais canaliculares, cuja composição está apresentada na Tabela II.2 (WYNGAARDEN & SMITH, 1986). O volume da bile varia de 500 a 1500 mL por dia, dependendo da quantidade e da espécie de alimento ingerido. A maior fração do volume biliar é produzida pelos hepatócitos e se correlaciona diretamente com o débito de sais biliares. Estes são sintetizados pelos hepatócitos a partir do colesterol. Este processo envolve uma etapa que limita a velocidade através da ação da enzima 7α-hidroxilase. Os dois ácidos biliares primários sintetizados, no fígado e constituidos por colesterol trihidroxicólico e dihidroxiquenodeoxicólico, são conjugados com

Tabela II.2 - Composição média da bile da vesícula humana (grama/decilítro)

COMPOSIÇÃO		% POR COMPONENTES	% TOTAL DE SÓLIDOS
Lipídeos	Ácidos Biliares	12,00	91
	Lecitina	3,00	
	Colesterol	0,50	
Bilirrubina		0,15	9
Proteína		0,10	
Potássio		0,05	
Cálcio e Magnésio		0,06	
Cloro		0,08	
Bicarbonato e Fosfato		0,04	

a glicina ou a taurina para melhorar a solubilidade antes de serem secretados. Depois de penetrarem no intestino, os ácidos biliares ajudam na absorção da gordura e são então reabsorvidos em grande parte no íleo. Aqueles que atingem o cólon são parcialmente convertidos pelas bactérias, que dehidroxilam os ácidos biliares primários em secundários, deoxicólico e litocólico, Figura II.4, (BOCKUS, 1985). Cerca de 30% dos ácidos biliares recém-formados são reabsorvidos pelo cólon, conjugados no fígado e excretados na bile. O ácido litocólico é, também, sulfatado durante a transferência hepática e, depois disso, é mal absorvido (WYNGAARDEN & SMITH, 1986). No entanto, os ácidos cólicos, queno e deoxicólico são absorvidos e sofrem uma circulação êntero-hepática que levam cerca de 6-10 horas diárias (DOWLING, 1972). A composição real da bile é de 40% de ácido cólico, 40% de ácido quenodeoxicólico, 18% de ácido deoxicólico e 2% de ácido litocólico, cada um conjugado com a glicina ou com a taurina em uma relação 3:1 (WYNGAARDEN & SMITH, 1986).

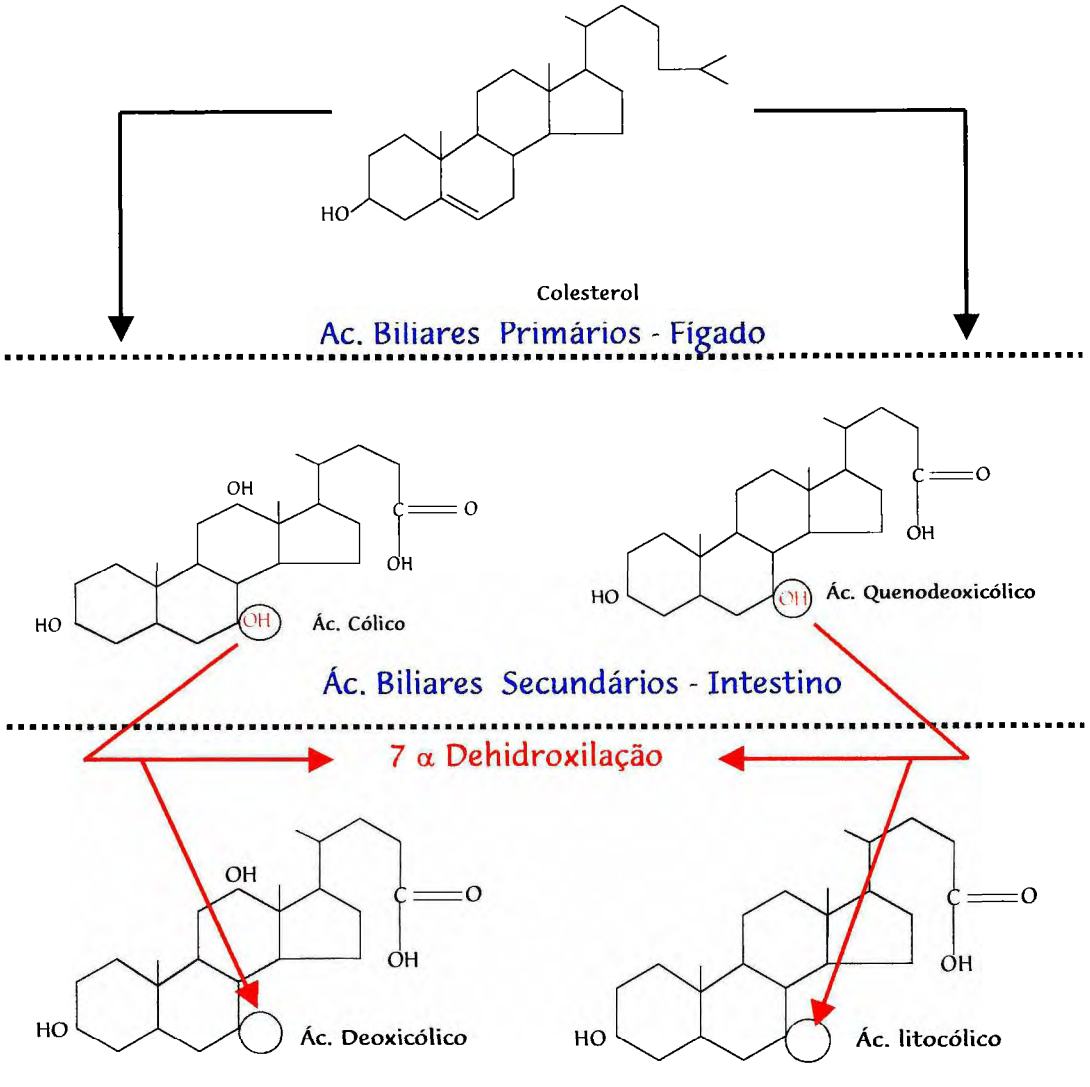

Figura II.4 - Metabolismo dos ácidos biliares

No entanto, observou-se que a bile de pacientes com colelitíase de colesterol apresentava colesterol em forma cristalina, o qual era precipitado pela solução (ADMIRAND & SMALL, 1968). Isto indica que a solubilidade do colesterol na bile é limitada e depende dos três maiores componentes lipídicos da bile: sais biliares conjugados, fosfolipídeos e o próprio colesterol (SMALL, 1970). Estes três componentes compreendem cerca de 90% do peso seco da bile vesícular (BOCKUS, 1985).

Pode-se ressaltar que o colesterol biliar é encontrado na forma não esterificada. Sua concentração não está relacionada com o nível de colesterol sérico e depende, somente, do metabolismo hepático de colesterol. Já, os fosfolipídeos biliares são insolúveis na água, hidrolisáveis no intestino e não existem na circulação êntero-hepática mas, contêm a lecitina (90%) com pequenas quantidades de lisolecitina (3%) e o fosfatídil etanolamina (1%) (DOWLING, 1972).

O colesterol é insolúvel na água e portanto será insolúvel na bile que é uma solução aquosa (cerca de 85-95% de água). Mantêm-se solúvel graças ao mecanismo complexo, ou seja, à formação de estruturas multimoleculares chamadas micelas (ADMIRAND & SMALL, 1968; CAREY & SMALL, 1978).

Os ácidos biliares contêm dois grupos polares: um hidrofílico e o outro hidrofóbico alifático ou aromático. Nas micelas, a parte hidrofílica está voltada para o exterior (que contém o solvente. Nesse caso, a água) e a porção hidrofóbica para o interior da micela. A lecitina é o componente mais importante dos fosfolipídeos biliares e, embora seja insolúvel em água, pode tornar-se solúvel pela ação dos sais biliares. O colesterol torna-se solúvel quando incorporado à miscela, por sua vez, composta de lecitina e sais biliares. Portanto, a eficiente solubilização do colesterol depende dos sais biliares e da lecitina. Ainda observou-se que, a formação de micelas está condicionada à concentração dos ácidos ou sais biliares, à estrutura química, à temperatura e ao pH da solução (ADMIRAND & SMALL 1968; CAREY & SMALL, 1978). A Figura II.5, mostra o diagrama de fase com diferentes percentagens de soluções de sais biliares, lecitina e colesterol. A linha curva representa o limite da zona micelar para soluções aquosas contendo 4 a 10% de sólidos. Qualquer solução, como a *A*, situada dentro dessa zona contém todo o seu colesterol em solução. Qualquer mistura, como *B*, fora dessa zona tem um excesso de colesterol sob a forma de precipitado ou uma solução supersaturada. Na verdade, os pontos *A* e *B* mostram a composição média da bile da vesícula de pessoas normais e de pacientes com cálculos de colesterol, respectivamente (ADMIRAND & SMALL, 1968).

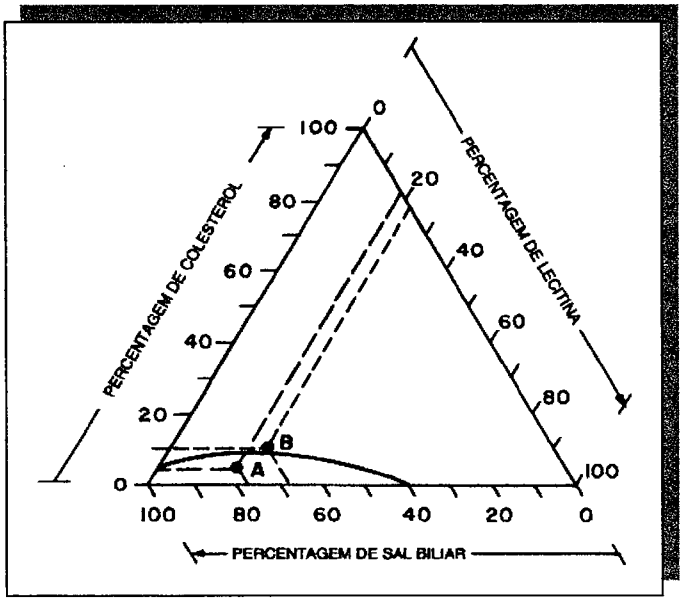

Figura II.5 - Curva de solubilidade do colesterol

O papel da vesícula biliar na gênese dos cálculos de colesterol, está por ser firmado. Alguns autores encontravam normalização da composição biliar após a colecistectomia, enquanto outros verificavam uma persistente saturação (RAIA & ZERBINI, 1988).

A vesícula age, provavelmente, apenas como reservatório, no qual o fenômeno de nucleação e crescimento do cálculo processa-se mais facilmente. Enquanto, no ducto biliar, o fluxo elevado impede a precipitação de cristais de colesterol e formação de cálculos (RAIA & ZERBINI, 1988).

A existência, na vesícula biliar, de condições como: concentração estratificada (biles de diferentes concentrações dispostas em camadas), temperatura constante e abundância de muco, favorece a precipitação e cristalização do colesterol (RAIA & ZERBINI, 1988).

Em relação a sua composição, Aschoff classificou os cálculos biliares em quatro seguintes grupos: inflamatórios, metabólicos, misto e estagnados. Os inflamatórios apresentam características múltiplas, facetadas e de coloração

marron amarelado. Os metabólicos se subdividem em: *solitários*, cálculos de colesterol de coloração branco amarelado; *múltiplos*, cálculos de bilirrubinato de cálcio, que apresentam forma nodular e coloração marron amarelado e os cálculos pigmentares de forma irregular e coloração preta. Os mistos apresentam aspectos do tipo metabólico e inflamatório. Os estagnados, apresentam forma oval de textura macia, coloração marron amarelada e formados, predominantemente, nos ductos biliares comuns. Tal classificação, entretanto, não tem nenhum embasamento com dados analíticos e um aspecto morfológico nesse sentido pode ser relacionado com a etiologia (ASCHOFF, 1924).

Segundo Sutor e Wooley, três tipos de cálculos biliares ocorrem em humanos: cálculos de colesterol e dois tipos de cálculos pigmentares, trivialmente, chamados preto e marron, Tabela II.3, (SUTOR & WOOLEY, 1971). Aproximadamente, 75% dos cálculos biliares são constituidos de cristais de colesterol e 25% formados pelo excesso de pigmentos biliares, estes classificados e subdivididos, percentualmente, com relação a sua ocorrência em: 20% de pigmentares pretos e 5% ou menos de pigmentares marrons (APSTEIN & CAREY, 1993).

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

Em relação aos cálculos de colesterol, foi confirmado através da cristalografia, que os maiores componentes são os cristais de colesterol monohidratados e pequena quantidade de uma forma cristalina alternativa de colesterol anidro (SUTOR & WOOLEY, 1971). Muitos desses cálculos, porém, contêm uma pequena quantidade de sais de cálcio, sozinhos ou combinados, como os seguintes compostos: carbonato de cálcio, fosfato de cálcio e palmitato de cálcio (SUTOR & WOOLEY, 1973). O conteúdo cálcico é maior em cálculos com um baixo teor de colesterol do que aqueles que contêm mais do que 80% em peso de colesterol (WHITING *et alii*, 1983).

Muitos trabalhos tem sido expandidos pela definição do núcleo dos cálculos biliares e, a maioria das observações sugerem que os centros desses cálculos contêm material pigmentado e bilirrubinato de cálcio, frequentemente presos em uma matriz orgânica, provavelmente, a glicoproteína. Das análises do restante do cálculo, verificou-se que essa matriz orgânica pigmentada está presente em uma camada padrão, alternada entre os planos de cristais de colesterol. Isso sugere que os cálculos biliares formam-se, passo a passo , ao redor de um centro de pigmentos biliares e/ou glicoproteina (SUTOR & WOLLEY, 1974; BILLS & LEWIS, 1975; BEER *et alii*, 1977, 1979). As análises por sonda eletrônica, mostram que os cálculos contêm quantidades variadas de : Na, K, P, Fe, Mg, Mn, Ca, Pb, S, Al, Ni, Cr, Ag, e B (MARKKANEM & AHO, 1972; BEER *et alii*, 1977, 1979).

A natureza do material pigmentado nos cálculos biliares tem sido estudada por muitos grupos, mas particularmente na Filadelfia por R. D. Soloway et alii, os quais classificaram os cálculos pigmentados em "Preto e Marron". Concluindo, pode-se dizer que esses dois tipos de cálculos mostram diferenças não só na sua composição química, como na sua micro estrutura, as quais podem refletir diferentes mecanismos na formação dos mesmos, Tabela II.4, (TROTMAN *et alii*, 1977; SOLOWAY *et alii*, 1982; MALET *et alii*, 1984). Todavia, foi observado que, como os cálculos pigmentados têm uma patogenia independente, os pacientes que apresentam esse tipo de cálculo não formam, simultaneamente, cálculos de colesterol (TROTMAN *et alii*, 1982).

Tabela II.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 INFECÇÕES	Raros	Raros	Usual
OUTRAS DOENÇAS	**	Hemólises; Cirroses	Obstrução biliar parcialmente crônica

**Radiação-opaca significa dizer que podem ser observados por raios X* (SUTOR & WOOLEY, 1971; SHEILA, 1975).

***Devem-se considerar fatores relacionados a nucleação do colesterol, supersaturação da bile, função da vesícula biliar e circulação de sais biliares êntero-hepática.

Tabela II.4 - Características dos cálculos pigmentares "Preto x Marron".

PRETO	MARRON
Brilhante	Marron escuro
Dificilmente esmagável	Facilmente esmagável
Encontrado na vesícula biliar	Encontrado atráves do trato biliar
Bile estéril	Bile infectada
Associado com hemólise e cirrose de pessoas idosas	Associado com obstrução biliar parcialmente crônica
40% de bilirrubinato de cálcio	60% de bilirrubinato de cálcio
Traços de palmitato de cálcio	15% de palmitato de cálcio
6% de carbonato de cálcio	Traços de carbonato de cálcio
2% de colesterol	15% de colesterol

Para explicar a patogênese dos cálculos biliares de colesterol, pigmentares preto e marron, Carey descreveu três modelos (CAREY, 1993). O primeiro descreve o processo de formação dos cálculos de colesterol, que através do diagrama de Venn, mostrado na Figura II.6, apresenta os três grandes fatores que determinam a sua constituição: supersaturação, nucleação e hipomotilidade, três mecanismos, que ocorrem simultaneamente e geram o aparecimento dos cristais de colesterol monohidratado (CAREY, 1988). Ainda, na Figura II.6, observa-se que a cristalização do colesterol na bile, numa escala de tempo acelerada é provocada pelas supersaturações não fisiológicas com essa substância, nucleação e hipomotilidade vesicular. Como mostrado pela longa seta (Figura 6), os cristais de colesterol se formam e se acumulam pela hipersecreção na

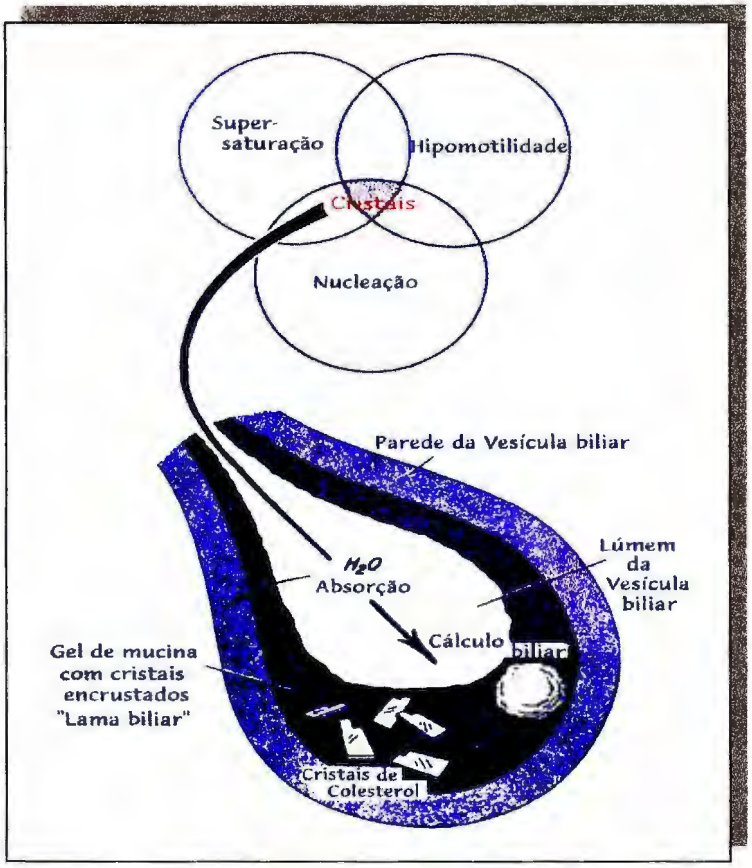

Figura II.6 - Diagrama de Venn das deficiências necessárias para cristalizar colesterol na bile, em uma escala de tempo acelerada (APSTEIN & CAREY, 1993; CAHALANE *et alii*, 1988).

vesícula biliar e evacuações incompletas (conhecida trivialmente como lama biliar), presos pelo gel de mucina (moléculas glicoproteíca), às quais atuam como agentes aglutinantes na aglomeração de cristais para formação dos cálculos biliares (APSTEIN & CAREY, 1993; CAHALANE *et alii*, 1988).

A supersaturação de colesterol decorre, principalmente, da excessiva secreção hepática de colesterol na bile (HOFMANN, 1990). Já, a hipomotilidade da vesícula biliar é caracterizada, principalmente, pelo aumento rápido do volume residual (LAMONT & CAREY, 1992). Aparentemente, a hipomotilidade não é encontrada em cálculos pigmentares da vesícula biliar como inferido a partir de estudos em *óbitos*, mas é uma característica de

colesterólise da vesícula biliar, sugerindo que o excesso de moléculas de colesterol nas paredes desse órgão são agentes miotóxicos (BEHAR *et alii*, 1989). Nos pacientes com cálculos típicos de colesterol [e há pelo menos 25 milhões nos Estados Unidos (APSTEIN & CAREY, 1993)], aparecem como uma mistura de deficiências bioquímicas sutis nos processamentos hepatocíticos de colesterol resultantes de sua hipersecreção no interior da bile (LAMONT & CAREY, 1992). Carey relata que colesterol-associado ao próprio cálculo, mesmo no estado pré-cálculo, causa uma panóplia colateral de deficiências fisiopatológicas na bile, a qual, invariavelmente, propaga e amplifica o estado litogênico (CAREY, 1993).

Na Figura II.7 descreve-se a patogênese dos cálculos pigmentares pretos, os quais se formam em vesícula biliar estéril (CAHALANE *at alii*, 1988; CAREY, 1988) . Eles ocorrem com grande frequência em pacientes com hemólise crônica, independente de sua causa. É uma síndrome que se caracteriza pela hipersecreção de bilirrubina conjugada no interior da bile e por um deslocamento da proporção de bilirrubina diconjugada a favor da monoconjugada, especialmente monoglicuronídeos (FEVERY *et alii*, 1983; MURACA *et alii*, 1987). No caso de homem sadio, a bilirrubina não conjugada não é secretada no interior da bile. Sob condições fisiológicas normais, há uma modesta hidrólise da arvóre biliar de bilirrubinas glicuronídeas pela hepatobiliar β-glicuronidase (inibida não completamente pela β-glicaro-1-4 lactone) (HO *et alii*, 1986) com o resultado que a bilirrubina não conjugada constitue menos do que 1% do pigmento biliar total (CAHALANE *et alii*, 1988). Por isso, concentrações típicas de bilirrubina não conjugada na vesícula biliar são de 5 à 20 μM (CAHALANE *et alii*, 1988). Com hemólise, a produção de pigmento biliar pode aumentar mais do que 10 vezes (FEVERY *et alii*,1983; MURACA *et alii*, 1987; HO *et alii*, 1986). As bilirrubinas predominantes tornam-se monoconjugadas, mais facilmente hidrolizadas pelas β-glicuronidases endogênicas, produzidas no interior de um organismo, (CAHALANE *et alii*, 1988). Neste ínterim, 1% de hidrólise pode dar origem a valores muito altos do pigmento não conjugado, por exemplo, 200 μM, frequentemente excedendo em muito a solubilidade biliar (CAHALANE *et alii*, 1988).

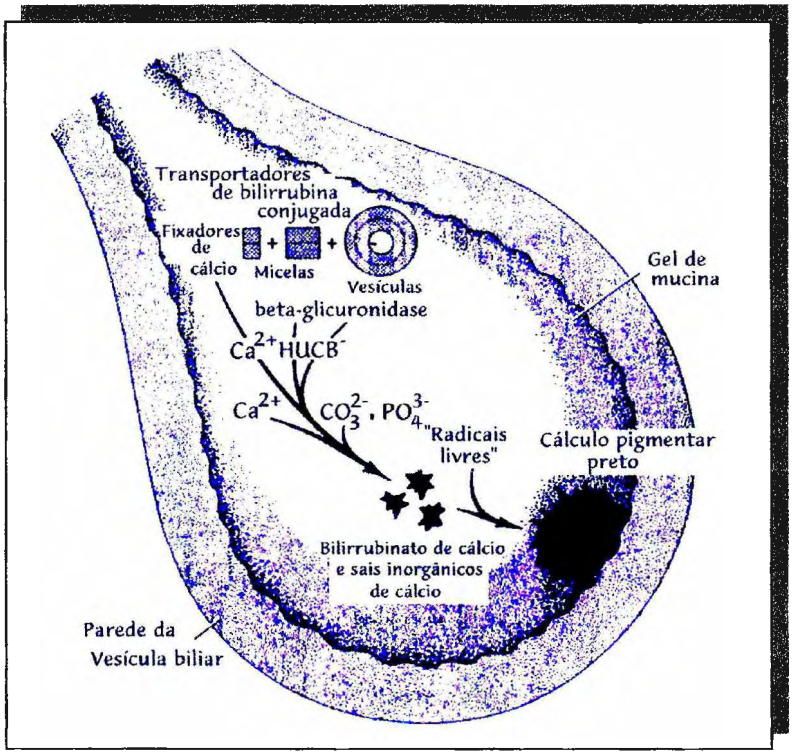

Figura II.7 - Esquema proposto para a patogenia dos cálculos pigmentar preto (CAREY, 1992).

O ácido do sal de cálcio [$Ca(HUCB)_2$] forma-se prontamente à valores típicos de pH da bile vesicular e é extremamente insolúvel (OSTROW, 1990; OSTROW, 1984). As bilirrubinas conjugadas são solúveis em água, todavia associadas na bile com o exterior hidrofílico das micelas e vesículas, (CAHALANE *et alii*, 1988), são também transportadoras de colesterol; conjugadas nos interiores hidrofóbicos dessas partículas tornam-se solúveis e o hidrogeno bilirrubinato de cálcio é resistente em qualquer quantidade (OSTROW, 1990; OSTROW, 1984).

Como as velocidades de secreção de sal biliar e lecitina não diminuem em pacientes hemolíticos, a única causa da supersaturação não fisiológica é a elevação no produto iônico do cálcio e espécies monoácidas da bilirrubina não conjugada (CAHALANE *et alii*, 1988). Como na patogênese de cálculos de colesterol, na dos pigmentares há fatores favoráveis importantes. Exemplo: como em humanos, existem também em animais, modelos hemolíticos, um retardamento na formação do cálculo. Na verdade, a prevalência de cálculos

aumenta com a idade e depende do sexo, e os cálculos não ocorrem em todos os sujeitos hemolíticos (CAHALANE *et alii*, 1988; TROTMAN *et alii*, 1980).

A Figura II.8 descreve-se a patogênese dos cálculos pigmentares marron, (CAHALANE *et alii*, 1988), que requerem a presença de estase (estagnação do sangue ou outro líquido) orgânico ou funcional dos ductos biliares junto com infecção crônica anaeróbica da bile (CAHALANE *et alii*, 1988; CAREY, 1992; CETTA, 1991). Como muitos casos de estase são causados pela migração dos cálculos de colesterol ou dos pigmentares pretos, a composição química da parte central do cálculo versus seu envólucro, reflete a origem da obstrução original (SAUERBRUCH *et alii*, 1983). Em pacientes com cálculos de vesícula, os riscos de adquirir coledocolelitiase secundária deste tipo aumenta com a idade (APSTEIN & CAREY, 1993). A maioria dos pacientes com cálculos ductais primários não tem evidências de obstrução, exceto para os próprios cálculos pigmentares. Isto sugere que, o movimento da doença de esfíncter de Oddi pode ser operativa. Em paises subdesenvolvidos, infecções parasitárias da árvore biliar pode resultar em infecção bacterial secundária com a consequente formação de cálculos marrons (APSTEIN & CAREY, 1993). Contrariamente à situação do ocidente, cálculos marrons em paises subdesenvolvidos, frequentemente, ocorrem intrahepaticamente (APSTEIN & CAREY, 1993).

A estase facilita a infecção bacterial anaeróbica, que leva à produção e acumulação de gel de mucina e milhares de citoesqueletos bacteriais nos ductos biliares. A hidrolase bacterial catalisa a hidrólise de todos os lipídeos biliares que contém amido ou ligações éster, enquanto a de ácidos biliares produz ácidos biliares livres (não conjugados) valendo-se de sais biliares conjugados. Já os ácidos palmíticos e esteáricos originam-se da lecitina biliar pela fosfolipase A_1 e a bilirrubina não conjugada é produzida pela β-glicuronidase, a partir das bilirrubinas glicuronídeas. Ácidos graxos saturados, parcialmente ionizados, bilirrubina não conjugada e sais biliares livres são ânions sensitivos a íons cálcio. Todavia, sendo, ligeiramente, solúveis por eles mesmos em valores de pH biliares, podem precipitar como tais ou como sais de cálcio (CAHALANE *et alii*, 1988). A hidrólise dos solubilizadores de colesterol resulta na nucleação de cristais de

colesterol monohidratado (CAHALANE *et alii*, 1988; CAREY, 1992) e , numa base de peso, constituintes de colesterol de 10 a 40% desses cálculos (CAREY, 1992). Pelo fato de o gel de mucina e componentes sólidos atuarem como uma armadilha e meio de cultura para o crescimento de bactéria anaeróbica, se torna difícil sua eliminação. Esse aumento do cálculo, além disso, provoca obstrução ductual e cria um ciclo vicioso em que a estase e a infecção bacterial são duradouras (CAHALANE *et alii*, 1988).

Resumidamente, pode-se dizer que, a supersaturação da bile com colesterol ou hidrogeno bilirrubinato de cálcio, $[Ca(HUCB)_2]$, é a marca do contraste das condições termodinâmicas responsáveis para a formação de cálculos de colesterol e pigmentar, respectivamente. A hipersecreção de colesterol hepático é a deficiência primária em doença de cálculo de colesterol e alvos da vesícula biliar. Suas origens são multi-fatoriais, e a hipersecreção produz, diretamente ou indiretamente, a heterogeneidade de deficiências na função vesicular, incluindo a hipomotilidade e a hipersecreção de mucina. Uma consequência maior é o aumento da libertação duodenal de bile hepática, interdigestivamente, a qual aumenta a hidrofobicidade de sais biliares, acentua o ciclo êntero-hepático, e diminui o tamanho dos sais biliares, os quais voltam a promover a sequência litogênica em muitos caminhos. A hipersecreção de bilirrubina conjugada aumenta a produção de bilirrubina não conjugada em hemólises, ciclo êntero-hepático, e/ou solubilização incompleta de bilirrubina não conjugada na bile exemplificando a condição fisiopatológica de pacientes com cálculos pigmentares pretos (CAREY, 1993). No entanto, o pigmento é quimicamente degradado e polimerizado, provavelmente, por radicais livres durante o longo tempo de residência na vesícula biliar.

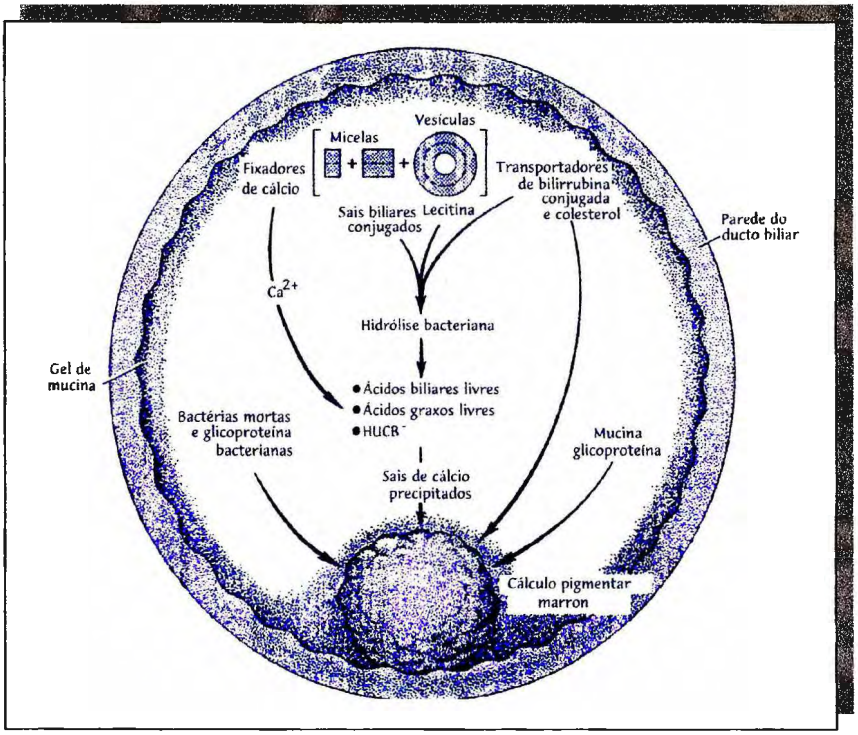

Figura II.8 - Esquema proposto para a patogenia do cálculo pigmentar marron nos ductos biliares humanos (CAREY, 1992).

A patogenia dos cálculos de colesterol e dos pigmentares pretos é físico-química e resulta, principalmente, das alterações nos lipídeos e lipopigmentos, os quais fazem parte da composição da bile vesicular. Além disso, com algumas exceções, os cálculos de colesterol e os pigmentares pretos são formados apenas na vesícula biliar em ambiente estéril de bactérias. No entanto, observou-se que os pigmentares pretos nem sempre ocorrem, em ambiente, sem presença de bactérias. Já, os cálculos pigmentares marrons tornam-se como resultado de infecção crônica da bile, provocada por bactérias do tipo anaeróbica.

Diferentemente, os cálculos pigmentares marrons são o resultado da estase do ducto biliar e infecção da árvore biliar com a hidrólise associada de lipídeos biliares e bilirrubina conjugada, que resultam na precipitação de vários sais orgânicos de cálcio (CAREY, 1993). Esses ocorrem, especificamente, nos ductos biliares extrahepáticos e são menos comuns em ductos biliares intrahepáticos. Entretanto, por comparação de alguns resultados, verificou-se que

esses cálculos, raramente, formados na vesícula biliar, são considerados conseqüência de uma colecistite aguda (CAREY, 1988; CAHALANE *et alii*, 1988).

MAGNUSSON *et alii* (1992) sugeriram que, pacientes com cálculos biliares têm bile vesícular menos ácida e mais saturada com carbonato de cálcio do que pacientes sem cálculos biliares. Essa deficiência de bile acidificada pode desempenhar uma função na sua formação. Por isso, comparou-se o pH da bile vesicular , íons cálcio e índice de saturação do carbonato de cálcio dos pacientes submetidos a qualquer remoção acidental da vesícula (grupo controle com 23 pacientes) ou colecistectomia eletiva para cálculos biliares (grupo com 55 pacientes). Os cálculos biliares foram classificados cada um como colesterol (grupo com 39 pacientes) ou cálculos pigmentares pretos (grupo com 16 pacientes). Nenhuma diferença foi notada no pH da bile vesicular entre os pacientes do grupo controle, e os com cálculos de colesterol e cálculos pigmentares. Além disso, não foi notada diferenças na concentração de íons cálcio e do índice de saturação do carbonato de cálcio (CCSI) para os três grupos. O pH da bile vesicular dos pacientes considerados adicionais (grupo com 49 pacientes), e que apresentavam colecistite aguda, obstrução do ducto biliar comum, infecção no trato biliar, e obstrução no ducto cístico, foi significativamente, mais ácido. Conclui-se, portanto, que nenhuma deficiência de acidificação biliar provocou aumento da saturação de carbonato de cálcio não se explicando o porquê da formação dos cálculos biliares humanos de colesterol ou de pigmentares (MAGNUSON *et alii*, 1992).

Embora muitos fatos, relatados pela literatura científica, sobre a patogênese dos cálculo biliares sejam conhecidos, ainda restam inúmeros problemas a serem resolvidos. Ainda hoje, pesquisadores não têm envidado esforços para esclarecer a causa da formação dos cálculos biliares e, têm desenvolvido estudos interdisciplinares, visando uma melhor definição da composição química desses materiais, utilizando, para isso, metodologia analítica.

II.2. ANÁLISE TÉRMICA

II.2.1. Histórico

Os métodos termoanalíticos iniciaram-se a partir do momento em que o homem consolidou seu domínio sobre a ação do fogo, utilizando-o para caracterizar diversos materiais. Em termos mundiais, essas técnicas começaram a evoluir, gradativamente, com o auxilio de grupos de pesquisadores que, através de seus trabalhos de pesquisa, acreditaram na sua futura potencialidade (DUVAL, 1963; KEATTTCH & DOLLIMORE, 1975; SZABADVARY & BUZAGH-GERE, 1979; GIOLITO, 1988). O progresso científico e tecnológico fez com que a instrumentação termoanalítica atingisse um elevado grau de sofisticação (LIPTAY, 1971 E 1982; MEISEL, 1984). Nas últimas décadas, as técnicas termoanalíticas adquiriram uma importância marcante. Em 1965 foi fundada a International Confederation for Thermal Analysis, ICTA e, devido ao crescimento dessas técnicas, o periódico Analytical Chemistry vem publicando desde 1958, nos anos pares, os Thermal Analysis Reviews. Outro marco importante foi a criação dos periódicos: Journal Thermal Analysis (1969), Thermochimica Acta (1970) e Thermal Analysis Abstract (1972), os quais vêm publicando, anualmente, milhares de artigos que relatam sua aplicação na área de Química, assim como, em muitos outros setores científicos e tecnológicos.

No começo da década de 70, os estudos relacionados com a análise térmica iniciaram-se em nosso laboratório no IQ-USP pelo Prof. Dr. Ivo Giolito que, com sua dedicação para essas técnicas, divulgou-as e disseminou-as de norte ao sul do Brasil. Atualmente, os seus ex-orientandos, docentes e/ou pesquisadores de diversos lugares do país, sob orientação do Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos, vêm dando continuidade a essa divulgação, tornando possível o aperfeiçoamento científico da análise térmica no Brasil.

Nos últimos dez anos, com a formação de novos pesquisadores e a associação destes com os fabricantes desta instrumentação, a Análise Térmica

cresce, consideravelmente, em diversos campos de pesquisa. Atualmente, muitas Universidades, Centros de Pesquisas e Indústria, já dispõem de equipamentos, que são empregados como importantes ferramentas na pesquisa, no desenvolvimento de novos produtos, no controle de qualidade de materiais, etc.. (IONASHIRO, 1993).

A análise térmica é um conjunto de técnicas pelas quais uma propriedade física de uma substância (e/ou de seus produtos de reação) é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO & GIOLITO, 1980; GIOLITO & IONASHIRO, 1988). Destas técnicas, as mais amplamente difundidas e utilizadas são a termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), a análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC).

II.2.2. Termogravimetria(TG)/Termogravimetria Derivada (DTG)

A Termogravimetria é uma técnica de análise térmica em que a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada como uma função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer, com detalhes, as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias e estabelecer a faixa de temperatura em que essas adquirem composição química definida ou quando as temperaturas começam a se decompor (dados importantes em operações analíticas), além de acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação (combustão), decomposição, etc. A TG pode ser classificada em: isotérmica, quase-isotérmica e dinâmica. Na TG isotérmica, a massa da amostra é registrada como uma função de tempo à temperatura constante. Na TG quase-isotérmica, a amostra é aquecida até massa constante e, finalmente, na TG dinâmica há um acompanhamento das variações de massa sofridas pela amostra em função da temperatura, quando esta é submetida a um resfriamento ou aquecimento linear (WENDLANDT, 1986).

Os experimentos para se avaliarem as variações na massa de um material em função da temperatura são executados com uma termobalança, que deve permitir o trabalho sob as mais variadas condições experimentais. As curvas geradas possibilitarão obter informações quanto à estabilidade térmica da amostra, composição e estabilidade dos compostos intermediários e produto final.

No método termogravimétrico convencional ou dinâmico são registradas as curvas de massa da amostra (m) em função da temperatura (T) ou do tempo (t), ou seja:

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

Nessas curvas, os degraus obtidos em relação ao eixo de ordenadas correspondem às variações de massa sofridas pela amostra e permitem obter dados que podem ser utilizados com finalidades quantitativas.

A termogravimetria derivada (DTG) é o registro da curva TG, na qual se deriva a massa em relação ao tempo (dm/dt), em função da temperatura ou do tempo, ou seja:

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

Desta maneira, são obtidas curvas que correspondem à derivada primeira da curva TG e nas quais os degraus observados são substituídos por picos que delimitam áreas proporcionais às alterações de massa sofridas pela amostra.

A curva DTG apresenta as informações de uma forma visualmente mais acessível (maior resolução), além de permitir com base na altura do pico, a

qualquer temperatura, obter a razão de Δm naquela mesma temperatura, assim como, permite a pronta determinação da temperatura do pico máximo ($T_{máx}$), onde Δm ocorre mais rapidamente.

As curvas TG/DTG, Figura II.9, ilustram o processo de termodecomposição de uma amostra do padrão de colesterol, utilizada para verificar as condições da instrumentação e avaliar o comportamento térmico dessa substância, que é parte integrante do material em estudo nesse trabalho. Pode-se observar, claramente, duas etapas principais de perda de massa.

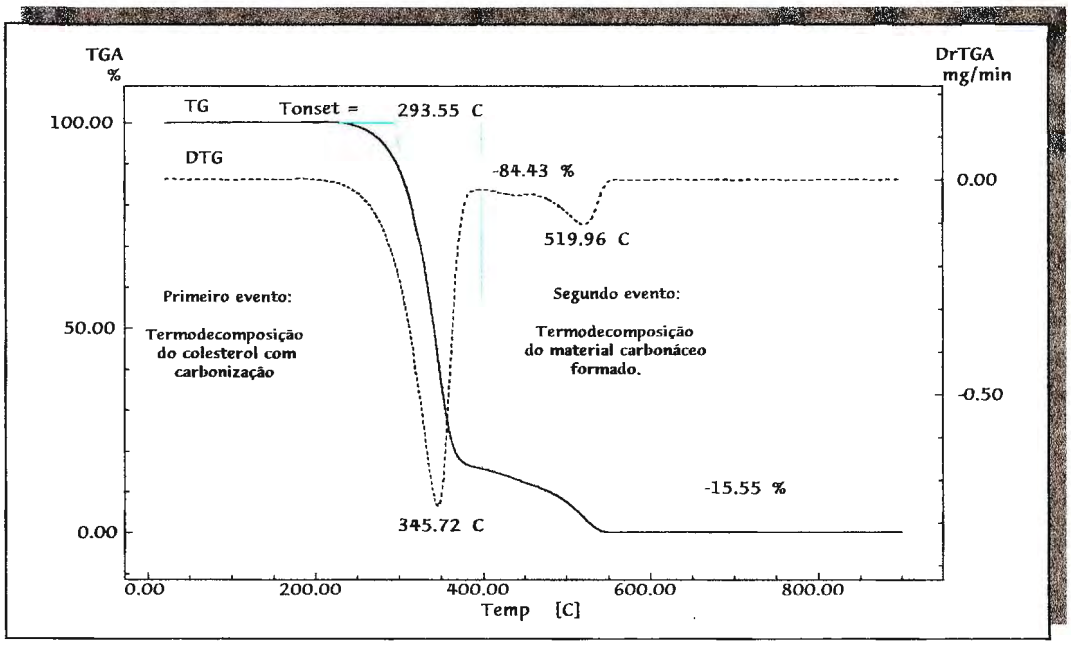

Figura II.9 - Curvas TG/DTG do padrão de colesterol, obtidas na termobalança, TGA-50, sob atmosfera dinâmica de ar e razão de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

Como em qualquer técnica instrumental, existe na termogravimetria um grande número de fatores que afetam a natureza, precisão e exatidão dos resultados experimentais. Dentre estes, pode-se citar o tamanho da amostra, razão de aquecimento, natureza do gás que atua sobre a amostra, etc (WENDLANDT, 1986).

No levantamento bibliográfico realizado, foi encontrado apenas um artigo de 1993, envolvendo análise térmica e cálculos biliares (ALEXANDER *et alii*, 1993). Nesse estudo foi demonstrado que a TG/DTG pode ser usada para determinar várias proporções de colesterol, $CaCO_3$ e CaC_2O_4 em misturas sintéticas desses materiais. Baseada nessa constatação, a pesquisa foi estendida para investigar a composição de vinte amostras de cálculos biliares coletados de pacientes submetidos à intervenção cirúrgica nos hospitais de Toledo, e concluiram que todos os cálculos analisados continham colesterol como principal componente (ALEXANDER *et alii*, 1993).

II.2.2. Análise Térmica Diferencial (DTA)

A análise térmica diferencial é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) entre a substância e o material de referência (termoestável) é medida em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO & GIOLITO, 1980).

Às variações de temperatura na amostra são devidas as transições entálpicas ou reações, conhecidas como endotérmicas ou exotérmicas. A curva DTA representa os registros de ΔT em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos do tipo exotérmicos, enquanto os descendentes, os endotérmicos. No caso de transições de segunda ordem (define-se como, a passagem do estado quebradiço para um estado borrachoso sofrida por uma molécula, quando é submetida a uma programação de temperatura de resfriamento para o aquecimento) observa-se mudança de linha base, sem picos como, por exemplo, a transição vítrea evidenciada por uma variação na linha base no sentido endotérmico. A Figura II.10, ilustra uma curva DTA de uma amostra de um sal de lantânio caracterizando um evento endotérmico e dois exotérmicos, bem definidos.

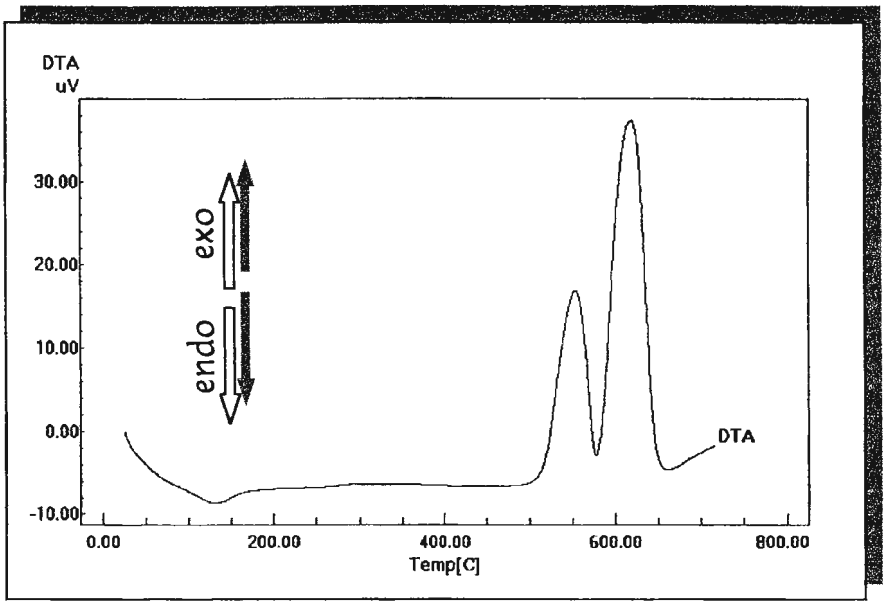

Figura II.10. Curva DTA obtida sob atmosfera dinâmica de He e razão de aquecimento de 40 °C min^{-1} de um amostra de $La(C_7H_7SO_3)_3.2H_2O$.

II.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Calorimetria exploratória diferencial é a técnica pela qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura (IONASHIRO & GIOLITO, 1980). A DSC é uma técnica derivada da DTA, por isso, são consideradas técnicas semelhantes e complementares (GIOLITO, 1988), pois, permitem avaliar as variações entálpicas que ocorrem com uma dada substância durante um processo de aquecimento ou resfriamento. A palavra "diferencial" enfatiza as medidas que envolvem tanto a própria substância como o material de referência, que deve ser termicamente estável. A definição formal dessas duas técnicas foi aprovada pela IUPAC (MACKENZIE, 1985; GIOLITO, 1988).

O DTA nos fornece dados qualitativos de variações de entalpia e permite executar trabalhos em faixas de temperaturas superiores a 1000°C. Porém, o DSC, pelo seu próprio refinamento, possibilita acompanhar e obter

dados quantitativos, quanto às alterações físicas ou químicas da amostra, tais como: mudança de estado físico (fusão, ebulição, etc), transições de fase (modificações na estrutura cristalina) ou reações de desidratação, de decomposição, de oxi-redução, etc (WENDLANDT, 1986), no entanto, a temperatura de operação da célula não excede 725°C.

Resumindo, pode-se dizer que, dentro dos limites operacionais de temperatura a célula DSC executa todas as aplicações do DTA, além de fornecer informações quantitativas de um dado material em relação a quantidade de calor envolvida nos processos, caracterizando, com isso, o seu emprego em diversos estudos, envolvendo diferentes tipos de sistemas.

Historicamente, foram criados dois tipos de DSC: de compensação de potência (desenvolvido e patentiado pela Perkin-Elmer Corporation) e de fluxo de calor (desenvolvido por outras empresas, como por exemplo, a Mettler Toledo, Shimadzu Corporation, Netzsch, TA Instrument, Setaram e outras).

No DSC de compensação de potência a amostra e a referência são aquecidas em compartimentos separados, individualmente. Isto torna-se possível manter a amostra e a referência em condições isotérmicas, ao contrário da técnica DTA. Assim, se a amostra sofre alterações de temperatura devido a um evento endotérmico ou exotérmico em função do aquecimento ou resfriamento a que é submetida, ocorre uma modificação na potência de entrada do forno correspondente, de modo a se anular esta diferença. Isto consiste no "balanço nulo" de temperatura.

O desempenho do DSC com fluxo de calor é semelhante ao de com compensação de potência (MCNAUGHTAN & MORTIMER, 1975; BROWN, 1988), porém esta técnica foi desenvolvida a partir do DTA, para contornar a patente do DSC com compensação de potência. A principal diferença em relação ao DTA consiste na execução de medidas quantitativas, uma vez que o DSC com fluxo de calor possui uma resistência térmica bem definida, sendo adequado para esse tipo de medida. Nesse sistema DSC, a amostra e a referência são colocados em cadinhos idênticos, localizados sobre um disco termoelétrico de *constantan*, e aquecidos por uma única fonte de calor. O calor é transferido através do disco

para a amostra e a referência, e o fluxo de calor diferencial (ΔT) entre os dois é controlado por termopares conectados abaixo dos cadinhos. Dessa forma, a diferença no fluxo de calor da amostra e da referência é diretamente proporcional a diferença de potência das junções dos dois termopares (HAINES, 1995).

A principal diferença de interpretação entre os dois métodos de medida do DSC está na forma de apresentação dos resultados. Ou seja, no DSC com compensação de potência foi adotada a convenção termodinâmica, onde um evento endotérmico (ΔH>0) é caracterizado por um pico ascendente na curva DSC, enquanto no DSC com fluxo de calor esse mesmo evento é representado na curva DSC por um pico descendente (BROWN, 1988; WENDLANDT, 1986). Além disso, no DSC com fluxo de calor o sinal é originado da diferença da temperatura entre a amostra e a referência; entretanto, no DSC com compensação de potência o sinal é proveniente do calor diferencial fornecido pela amostra e a referência (CHARSLEY & WARRINGTON, 1992). As curvas DSC, Figuras II.11 e II.12, ilustram o comportamento térmico, referente ao aquecimento e resfriamento, de uma amostra do padrão de colesterol, respectivamente, obtidas numa célula DSC de Fluxo de Calor e de Compensação de potência. Pode-se identificar, com bastante clareza, o processo de fusão durante o aquecimento e de cristalização no resfriamento. Estão indicadas em cada caso, as temperaturas referentes ao início extrapolado (onset), final extrapolado (endset) e temperatura do pico do evento e ainda os valores de ΔH. No caso do processo de fusão a temperatura onset corresponde ao ponto de fusão do material.

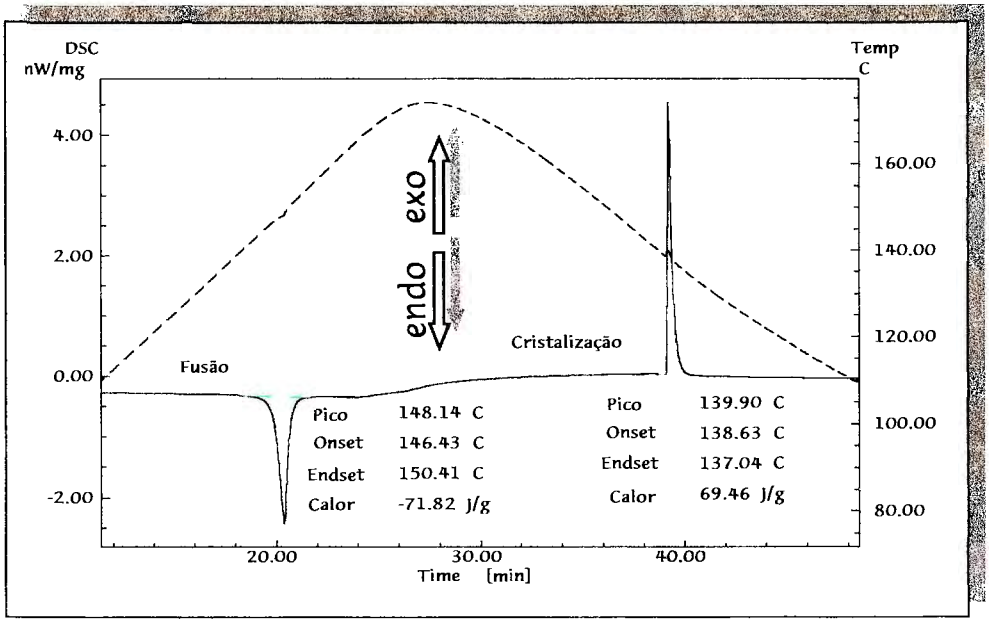

Figura II.11 - Curva DSC do padrão de colesterol, obtida na célula DSC de fluxo de calor, sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C min^{-1}.

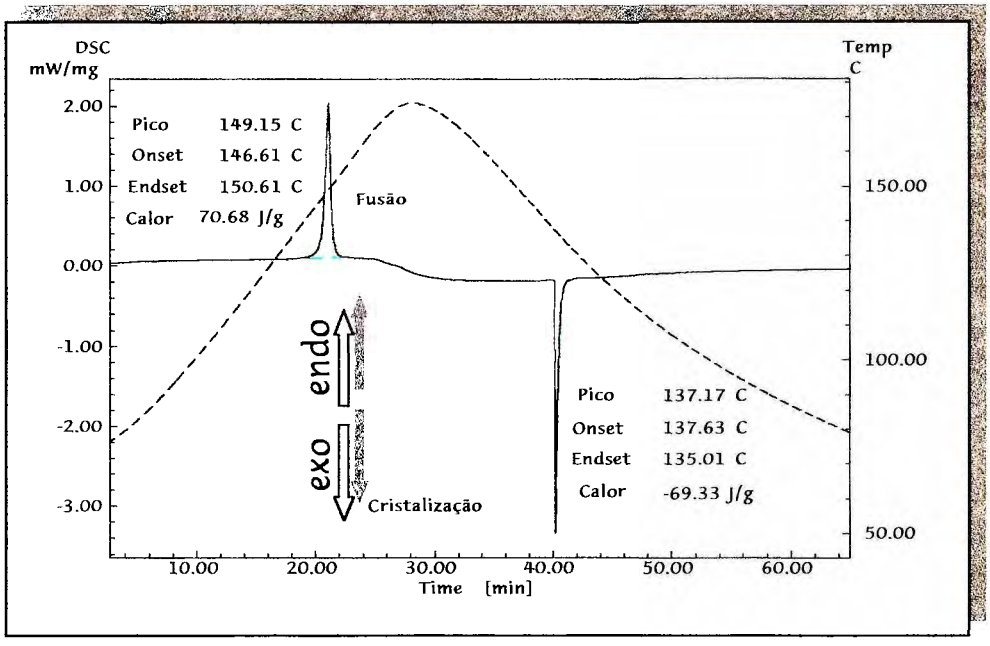

Figura II.12 - Curva DSC do padrão de colesterol, obtida na célula DSC de compensação de potência, sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento e resfriamento de 10 °C min^{-1}.

II.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

II.3.1. Análise Elementar (A.E)

Análise Elementar é a técnica instrumental utilizada na determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio num dado material. O ensaio é executado colocando-se a amostra numa cápsula de estanho que é introduzida num tubo de combustão, Figura II.13, na temperatura de 925°C, sob atmosfera de O_2 (PERKIN ELMER CORPORATION, 1988). Durante a combustão forma-se uma mistura de voláteis constituídos por CO_2, H_2O, e óxido de nitrogênio (N_2O_x), que é arrastada por um vazão contínua de He para um tubo de quartzo preenchido com cobre, cuja função é de reduzir os N_2O_x para N_2. O tubo de combustão contém sais de prata, vanádio e tungstênio, que têm a finalidade de reter as outras substâncias formadas durante a queima (decomposição térmica).

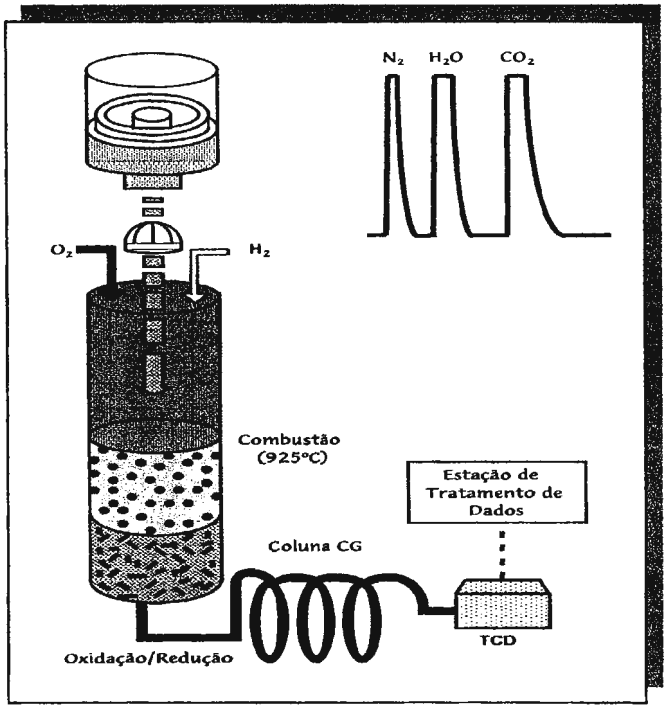

Figura II.13 - Esquema do processo de determinação de carbono, hidrogênio e nitrogênio por análise elementar.

A mistura de voláteis passa por uma coluna cromatográfica empacotada com sílica e os constituintes são separados por ordem de polaridade: N_2< CO_2< H_2O, os quais são detectados por um detector de condutividade térmica (MIYANO *et alii*, 1996).

Como ilustração, observa-se na Tabela II.5, a comparação dos valores teóricos de carbono e hidrogênio, calculados com base na fórmula molecular do colesterol, $C_{27}H_{46}O$, e os valores experimentais, obtidos pela da análise elementar.

Tabela II.5 - Comparação dos valores teóricos de carbono e hidrogênio com os experimentais, obtidos pela análise elementar do padrão de colesterol.

VALORES	% CARBONO	% HIDROGÊNIO
Teórico	83,87	11,99
Experimental	83,89	11,78

II.3.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

É a técnica instrumental que possibilita a caracterização da identidade de uma determinada substância a partir do espectro de absorção. As bandas do espectro são conseqüências dos diferentes modos normais de vibração de uma molécula, gerados pela incidência de uma onda eletromagnética na região do infravermelho (BELLAMY, 1975; NAKAMOTO, 1986).

Os aparelhos com Transformada de Fourier (FT) não utilizam grades ou prismas e sim, um interferômetro de Michelson que, após a incidência da onda eletromagnética na amostra, envia ao detetor a variação da intensidade do feixe da radiação, em função do tempo. Avançado programa de tratamento matemático converte esses dados no espectro da amostra (Intensidade da radiação versus o número de onda (cm^{-1}). Este tipo de sistema diminui

acentuadamente o tempo de resposta para obtenção de espectros e com alta resolução (PAVIA *et alii*, 1996).

A região do infravermelho, Figura II.14, se estende desde a extremidade vermelha da região do vísivel (0,75 μm ou 13333 cm^{-1}), até o início da região do microondas (300 μm ou 33 cm^{-1}). A maioria, porém, das aplicações da espectroscopia na região do infravermelho, compreende a faixa de 2,5 a 50 μm (4000 a 200 cm^{-1}), que é, usualmente, chamada de pseuda região do infravermelho. As regiões de menores e maiores comprimentos de ondas são chamadas, respectivamente, regiões de infravermelho *próximo e distante*, que embora bastante informativas, requerem muito estudo antes de serem utilizadas em âmbito qualitativo. Os dados de absorção na região do infravermelho costumam ser lançados em um gráfico, no qual o eixo da ordenada é representado pelas percentagens da transmitância e o da abscissa pelos números de onda (em cm^{-1}) ou comprimento de onda , λ, (em μm). O número de ondas tem a vantagem de ser diretamente proporcional à freqüência ou à energia da radiação, e a freqüência, pode ser diretamente relacionada às freqüências vibracionais (NAKANISHI, 1962; PAVIA *et alii*, 1996).

Todas as moléculas são constituidas de átomos unidos por ligações químicas. O movimento constante dos átomos e das ligações químicas pode ser comparado a um sistemas de *molas* e *bolas*, cujos movimentos podem ser considerados compostos de duas componentes, as vibrações de *estiramentos* (ν) e de *deformações* (δ). As freqüências destas vibrações não dependem apenas da natureza das próprias ligações, tais como: C-H ou C-O, mas também das massas dos átomos e das interações entre as vibrações. Esta situação é similar ao *sistema de molas e bolas*, em que a vibração de uma única mola está sob a influência de todo o sistema (NAKANISHI, 1962; PAVIA *et alii*, 1996).

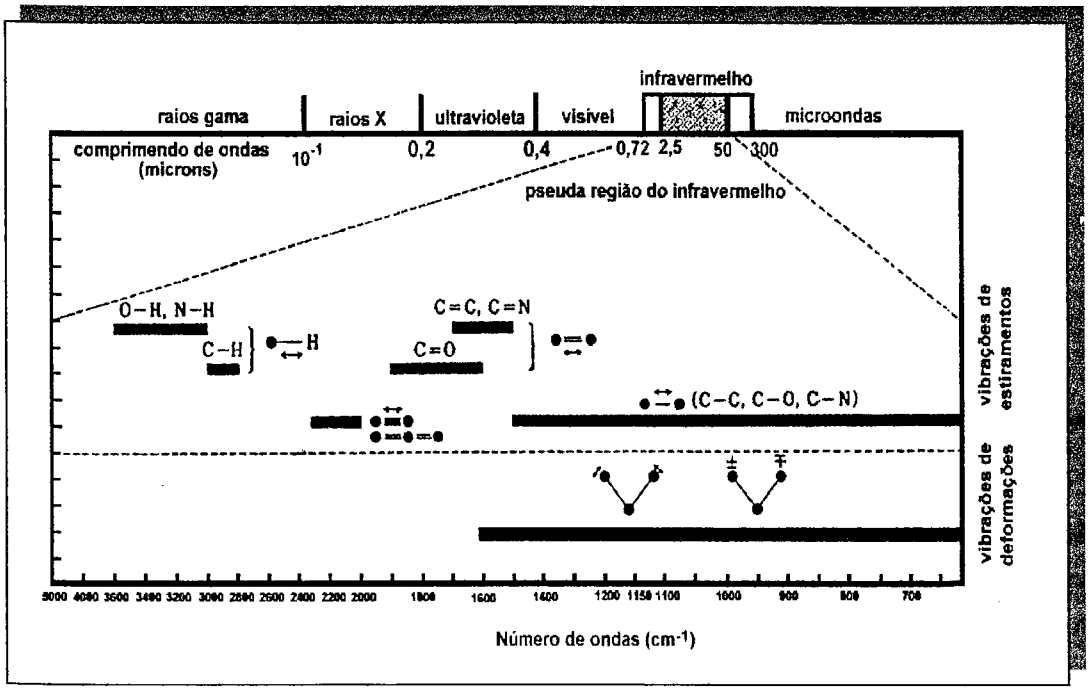

Figura II.14 - Vibrações de estiramento e deformações.

Os níveis de energias vibracionais de uma molécula são quantizados; por isso, somente o feixe de infravermelho com uma freqüência, correspondente àquela necessária para elevar o nível de energia de uma vibração, será absorvida.

Isto significa que, a amplitude da vibração particular é aumentada repentinamente e não gradualmente por uma certa quantidade. Por essa razão, quando a freqüência do feixe de infravermelho é alterada continuamente e a amostra é irradiada, somente certas regiões que correspondem às energias da radiação consumidas para *estirar* ou *deformar* as respectivas ligações serão absorvidas pela molécula. As freqüências da radiação não transmitidas correspondem às freqüências de absorção do composto que, naturalmente, estão ausentes. Então um registro da intensidade do feixe transmitido contra o número de ondas ou comprimento de ondas, denominado espectro de absorção na região

do infravermelho (NAKANISHI, 1962), dará uma curva evidenciando as bandas de absorção.

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) é considerado uma das propriedades mais características de um composto e se constitui numa ferramenta indispensável para a obtenção de informações estruturais. Em linguagem figurada, de maneira geral, corresponde à impressão digital da espécie

Como mencionado acima, as frequências das respectivas ligações numa molécula são afetadas por todas as vibrações da molécula. Certas vibrações, porém, tem freqüências características: ligações múltiplas são mais fortes do que ligações simples, e ligações do tipo X-H (N-H, O-H, C-H etc.) com átomos de hidrogênio terminais são, especialmente, leves. Aquelas correspondem à molas que são, especialmente, fortes, e essas as que se ligam a bolas terminais leves. Similar ao *sistema de molas e bolas*, as vibrações dessas ligações são afetadas pelo restante da molécula por uma extensão relativamente pequena. Assim, as frequências de estiramentos, dessas ligações específicas, aparecem dentro de uma faixa característica em torno de 3600 à 1500 cm^{-1} (Figura II.14) (NAKANISHI, 1962).

Na região abaixo de 1600 cm^{-1}, aparecem bandas em razão tanto de estiramentos de ligações simples, como: C-C, C-N, C-O, C-halogênio, etc., quanto de deformações angulares. No caso das ligações simples, a força de ligação é aproximadamente da mesma ordem e os átomos estão usualmente unidos de forma acumulativa, como por exemplo: C-C-C-O. Isto resulta em interações mútuas mais fortes, faixa mais larga de aparecimento das bandas e grande sensibilidade nas suas posições, mesmo para pequenas mudanças estruturais. A faixa de freqüência mais baixa do espectro na região do infravermelho, de 1300 até aproximadamente 650 cm^{-1}, é conhecida como *região de impressão digital*, na qual cada composto tem, especificamente, o espectro que lhe é característico (NAKANISHI, 1962; PAVIA *et alii*, 1996).

A posição das bandas de absorção é determinada pela força de ligação e a massa dos átomos envolvidos na ligação. Nas ligações mais fortes e massas menores, as frequências de absorção são mais altas, isto é, uma maior energia é

necessária para vibrá-las. Por exemplo, as forças das ligações aumentam das simples para as duplas e, consequentemente, para as triplas e as frequências de estiramentos, também, aumentam na ordem de 700 a aproximadamente 1500; de 1600 à 1800 e 2000 à 2500 cm^{-1} (**Figura II.14**). A vibração de estiramento da ligação O-H está à 3600 cm^{-1}, mas diminui para 2630 cm^{-1} na ligação O-D, em que a força de ligação é a mesma, mas a massa foi aumentada. A freqüência de estiramento C=O aparece entre 2000 a 1500 cm^{-1} e é muito sensível às diferenças na estrutura e ambiente, fato que torna as absorções da carbonila, extremamente, úteis em química orgânica (NAKANISHI, 1962; PAVIA *et alii*, 1996).

Uma vibração não é, necessariamente, acompanhada por uma banda de absorção na região do infravermelho. Uma absorção ocorre somente quando a vibração causa uma mudança na distribuição de carga dentro da molécula, ou seja, quando a incidência da radiação no infravermelho provoca vibracões com variação no momento de dipolo. Quanto maior a variação, mais intensa será a absorção. Portanto, bandas de hidrocarbonetos, que são compostos somente de átomos de carbono e hidrogênio, são fracas, mas bandas associadas com ligações que unem átomos diferentes, consideráveis, em suas eletronegatividades, por exemplo: C-N, C-O, C=O e C≡N, são usualmente muito fortes. Embora as freqüência de *deformação* e de *estiramento* de ligações simples apareçam na mesma região, as bandas de estiramentos de C-O e C-N, podem ser detectadas mais facilmente, porque são mais fortes do que as bandas de estiramentos C-C (NAKANISHI, 1962; PAVIA *et alii*, 1996).

Quando uma molécula heteronuclear vibra, a distância interatômica entre os átomos muda, assim como seu momento dipolar. A vibração da molécula produz um campo de dipolo elétrico alternado, cuja magnitude muda periodicamente com uma freqüência igual àquela da vibração. É este campo de dipolo elétrico que interage com o componente elétrico da radiação eletromagnética, causando a absorção de energia, que resulta no espectro do infravermelho.

Em uma molécula diatômica homonuclear não ocorre mudança no momento dipolar com a vibração e, portanto, não aparece nenhum campo de dipolo elétrico alternado. A molécula, então, não absorve radiação na região do infravermelho e não gera espectros. Quando a vibração molecular não produz mudança do momento dipolar, em razão da simetria, diz-se que a vibração fundamental é inativa na região do infravermelho (NAKANISHI, 1962; PAVIA *et alii*, 1996).

Como discutido, as bandas de absorção que aparecem para um certo grupo com uma intensidade relativamente alta numa faixa característica, e que são úteis para a identificação daquele grupo são chamadas de *frequências características ou bandas de absorção características.* Uma grande quantidade de dados relativos a essas bandas foram acumulados através do tempo e muitas bandas, na região de impressão digital, são efetivas para caracterizar vários grupos (NAKANISHI, 1962; PAVIA *et alii*, 1996).

A Figura II.15, mostra as absorções características do grupo hidroxílico alcoolíco. A bandas de estiramento O-H (1), graças à sua freqüência tipicamente alta, e a de C-O (3), em razão de sua intensidade, são especialmente úteis para identificação. As freqüências de deformação (2) e (4) são também empregadas, embora, raramente, para identificação. Contudo, visto que a vibração de uma ligação específica está sob influência sutil de outras ligações vizinhas, tanto a posição como a intensidade de uma banda, são diferentes conforme a estrutura da molécula e o estado físico. Por exemplo, o aparecimento das quatro absorções hidroxílicas mostradas na Figura II.15 dependerá: a) se o grupo hidroxílico está ligado a um átomo de carbono primário, secundário ou terciário; b) se o grupo está livre ou com hidrogênio ligado intermolecularmente, ou intramolecularmente; c) da força da ligação de hidrogênio, etc. Desse modo, uma comparação das bandas com a dos compostos similares e conhecidos, permite estimar qual a espécie de hidroxila existente e o seu estado. Esta estimativa é reforçada se as mudanças nas condições de medidas, (solventes, etc.) ou na estrutura química (oxidação à cetona, acetilação, etc.), estiverem acompanhadas por mudanças apropriadas nas bandas de absorção. As freqüências características

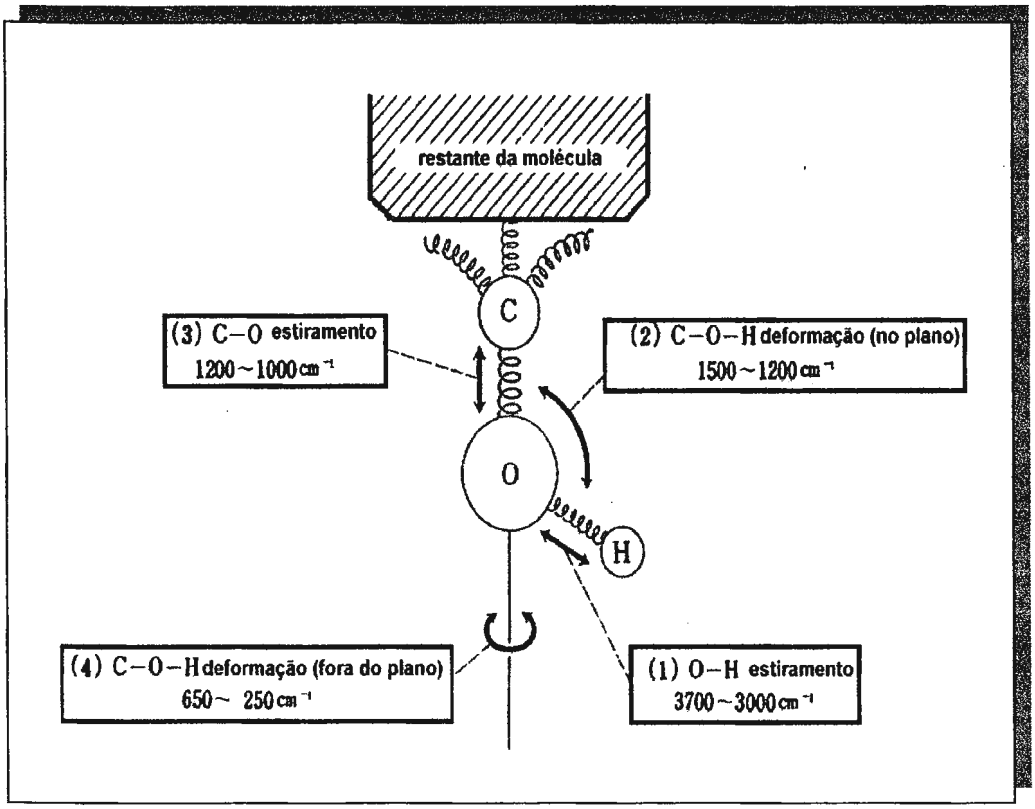

Figura II.15 - Vibrações e absorções do grupo hidroxílico alcoólico.

de muitos grupos são conhecidos e isso é importante para obtenção de informações qualitativas na espectroscopia no IV. As bandas de absorção correspondem a uma indicação direta do estado da ligação molecular e isso origina informações importantes do ponto de vista teórico (NAKANISHI, 1962).

A análise quantitativa, obtida pela proporcionalidade entre a intensidade da banda e a quantidade de amostra presente, é considerada, também, uma das aplicações de grande importância da espectroscopia na região do infravermelho.

As premissas fundamentais nas quais os químicos têm se baseado para utilização da espectroscopia de absorção, na região do infravermelho, para obtenção de dados estruturais, podem ser resumidos nos seguintes postulados:

1. Um composto exibe frequências características de um dado grupo na região do infravermelho.
2. Espectro de absorção de uma dada substância, geralmente, é específico para essa substância.
3. Espectro de absorção de misturas, geralmente, é aditivo, isto é, a soma dos espectros individuais dos componentes.
4. A intensidade de uma banda de absorção está relacionada à concentração da substância que absorve a radiação incidente.

A Figura II.16, apresenta o espectro de absorção no infravermelho de uma amostra do padrão de colesterol no qual se podem identificar as bandas de absorção mais características: a) a banda larga correspondente à freqüência de estiramento OH (ν_{OH}) em 3441 cm^{-1}; b) a banda forte de vibração de estiramento CH (ν_{CH}) em 2934 cm^{-1}; c) duas bandas de deformação CH (δ_{CH}) à 1462 e 1440 cm^{-1}; d) a banda à 1051 cm^{-1} atribuida à freqüência de estiramento da ligação OH na posição 3α.

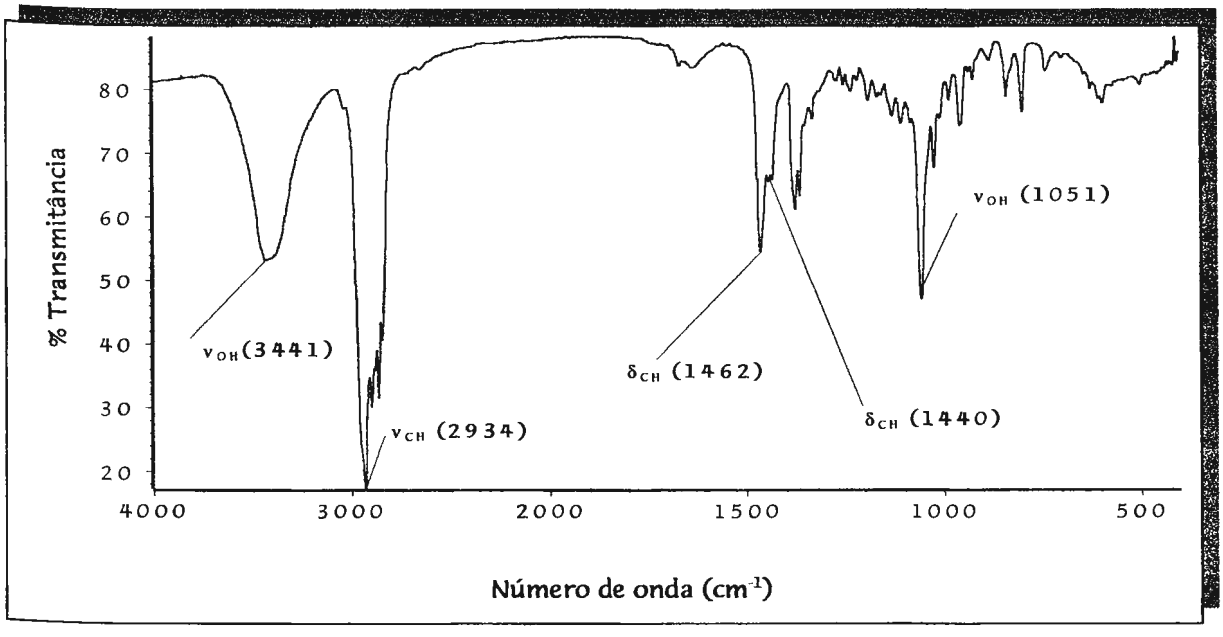

Figura II.16 - Espectro de absorção na região do infravermelho de uma amostra de padrão de colesterol.

II.3.3. Difratometria de raios X

Alguns compostos inorgânicos e/ou orgânicos podem apresentar uma estrutura de átomos ou moléculas regularmente distribuídos denominada de cristalina. No entanto, as que não apresentarem este arranjo regular são classificadas como amorfas. Por exemplo, o vidro.

O conceito da existência da estrutura cristalina é facilmente evidenciada em compostos inorgânicos que fazem parte da composição de alguns minérios, os quais em boas condições de cristalização, exibem excelentes formas geométricas. Como exemplo, têm sido citados os cristais de quartzo, mica e outros. Estas formas dos cristais são o reflexo de uma organização dos átomos existentes no mineral que pode ser descrito como pequenas unidades regulares ligadas umas às outras e formando o que é visto macroscopicamente. Praticamente, a maioria dos materiais inorgânicos são cristalinos, contudo uma parte considerada de compostos orgânicos apresentam estrutura do tipo amorfa.

A difratometria de raios X é uma técnica que identifica e estuda, em âmbito geral, a estrutura cristalina dos materiais. Os raios X, utilizados por essa técnica, são produzidos a partir do bombardeio do ânodo por elétrons do cátodo, acelerados por alta voltagem, considerados como ondas eletromagnéticas que, como tais, podem ser polarizadas, refratadas e refletidas e que, também, exibem importantes propriedades como: transparência a certos materiais, impregnação de filmes e ionização de gases. A característica ondulatória levou vários pesquisadores a calcular o comprimento de onda dessa nova radiação, da qual as mais utilizadas na difração de raios X, são as raias Kα, com comprimento de onda compreendidos entre 0,56 e 2,29Å (FORMOSO *et alii*, 1984).

O prof. Max Von Laue e os Braggs encontraram a resposta de como calcular este comprimento de onda, utilizando cristais como redes de difração. Debyer-Scherer, desenvolveu um método denominado "método do pó", também conhecido como método Debyer-Scherer, que permite obter informações qualitativas a respeito da estrutura cristalina para uma série de compostos de

propriedades características próximas (HANAWALT *et alii*, 1936; HANAWALT *et alii*, 1938).

Como ilustra a Figura II.17, a difração de raios X nos cristais resulta de um processo em que uma radiação monocromática, de comprimento de onda (λ), alcança um conjunto de planos cristalinos num ângulo θ, cujos átomos são representados por pontos pretos. A distância entre estes dois planos cristalinos é representada pela letra d, e o ângulo de incidência do feixe é representado por θ. A diferença de percurso (atraso "A") entre o feixe que incide no plano superior e o inferior é dado por:

$$\text{"A"} = AB + BC \qquad \text{eq. II.1}$$

onde:

$$AB = BC \qquad \text{eq. II.2}$$

assim:

$$\text{"A"} = 2AB \qquad \text{eq.II.3}$$

mas,

$$AB = d_{ABC}\text{sen}\theta \qquad \text{eq.II.4}$$

portanto,

$$\text{"A"} = 2\, d_{ABC}\text{sen}\theta \qquad \text{eq.II.5}$$

A diferença do caminho "A" entre o plano superior e o inferior é dado por um numero inteiro de comprimento de onda que aqui representamos por $n\lambda$, portanto,

$$n\lambda = 2d_{(ABC)} \operatorname{sen}\theta \qquad \text{eq. II.6}$$

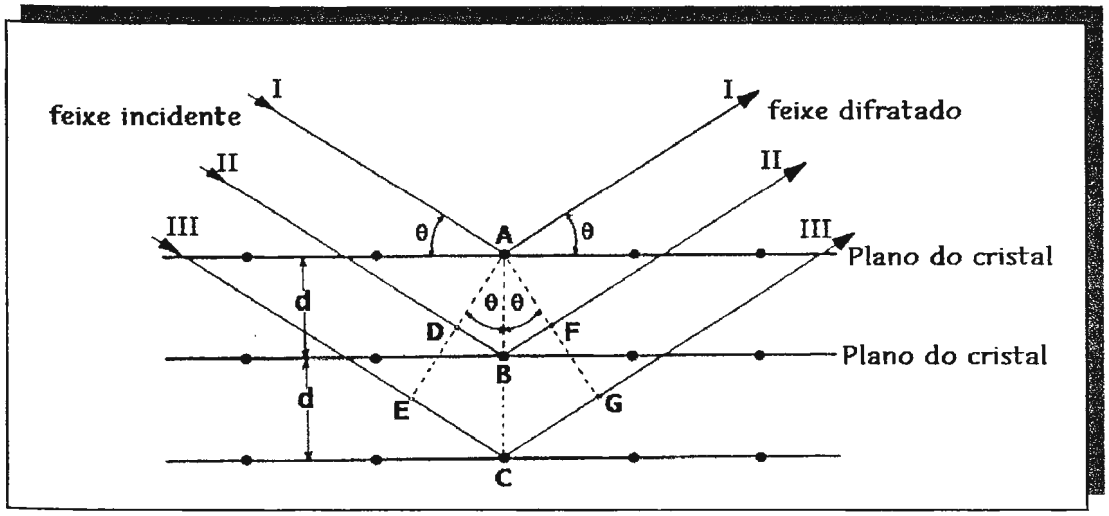

Figura II.17 - Representação gráfica da lei de Bragg (AZAROFF & BUERGER, 1958).

A **equação II.6** é conhecida como Lei de Bragg e estabelece uma relação direta entre o ângulo de incidência dos raios X e a distância interplanar.

Os ângulos θ, em que o cristal pode difratar raios X, dependem fundamentalmente dos espaçamentos interplanares $d_{(ABC)}$ do retículo. Os valores de d, por outro lado, dependem das dimensões da estrutura, significando que as posições de todas as reflexões de raios X de um cristal dependem só das dimensões da célula unitária. Como consequência, dois materiais, tendo o mesmo tipo e as mesmas dimensões da célula unitária, produzem quase o mesmo difratograma de raios X com relação à posição das reflexões, mesmo se não tiverem composição química semelhantes. De outra forma, as intensidades relativas das várias reflexões de um cristal dependem das atribuições dos diversos

planos estruturais que estão relacionados com o arranjo dos átomos na célula unitária. Portanto, a posição das reflexões e as intensidades relativas, que são dependentes, respectivamente, da célula unitária e do arranjo dos átomos (íons ou moléculas), são características da estrutura cristalina do material. A difração resultante de um cristal, compreendendo posições e intensidades das linhas de difração, é uma propriedade física fundamental da substância, servindo não só para identificação como também para o estudo de sua estrutura (FORMOSO *et alii*, 1984).

Neste trabalho, o equipamento utilizado para medir essas variáveis é chamado de difratômetro e consiste em um tubo de raios X, um porta amostras e um detector , como mostra a Figura II.18.

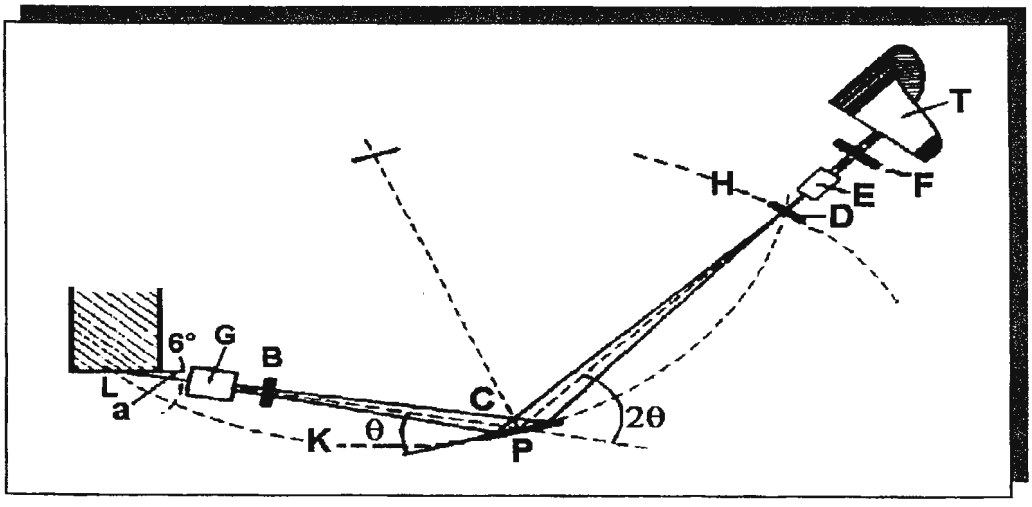

Figura II.18- Esquema de um difratômetro do tipo Bragg-Brentano

onde: L é a posição do tubo

C é a amostra

P é a posição do porta amostra

T é o detector

H é o círculo formado entre o detector e o tubo com seu centro no porta amostras

K é o círculo formado entre o tubo e a interseção com a linha H.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

O movimento do detector é feito de tal forma que varie o ângulo de incidência do feixe de raios X e assim gerar o que se chama de padrão de difração ou apenas difratograma. Os picos que aparecem no difratograma são as distâncias interplanares característica(s) da(s) espécie(s) presente(s) na amostra. Para identificá-las é utilizado um banco de dados que contém todos os compostos cristalinos existentes, chamado de ICDD-PDF (*Powder Diffracton File*). A limitação desta técnica ocorre para compostos isomorfos (com mesma estrutura atômica) e que tenham distâncias atômicas parecidas.

Uma ilustração de um difratograma de raios X obtido pelo método do pó pode ser observados na Figura II.19 para uma amostra de padrão de colesterol.

A discussão referente ao assunto de raios X, em geral, e difratometria em particular, é muito vasta. Entre muitos textos básicos, podem ser citados os de BUERGER, 1942; LAUER, 1952; KLUG & ALEXANDER, 1954; GUINIER, 1956 E ZUSSMAN, 1967; CULLITY, 1967; POST & BISH, 1989.

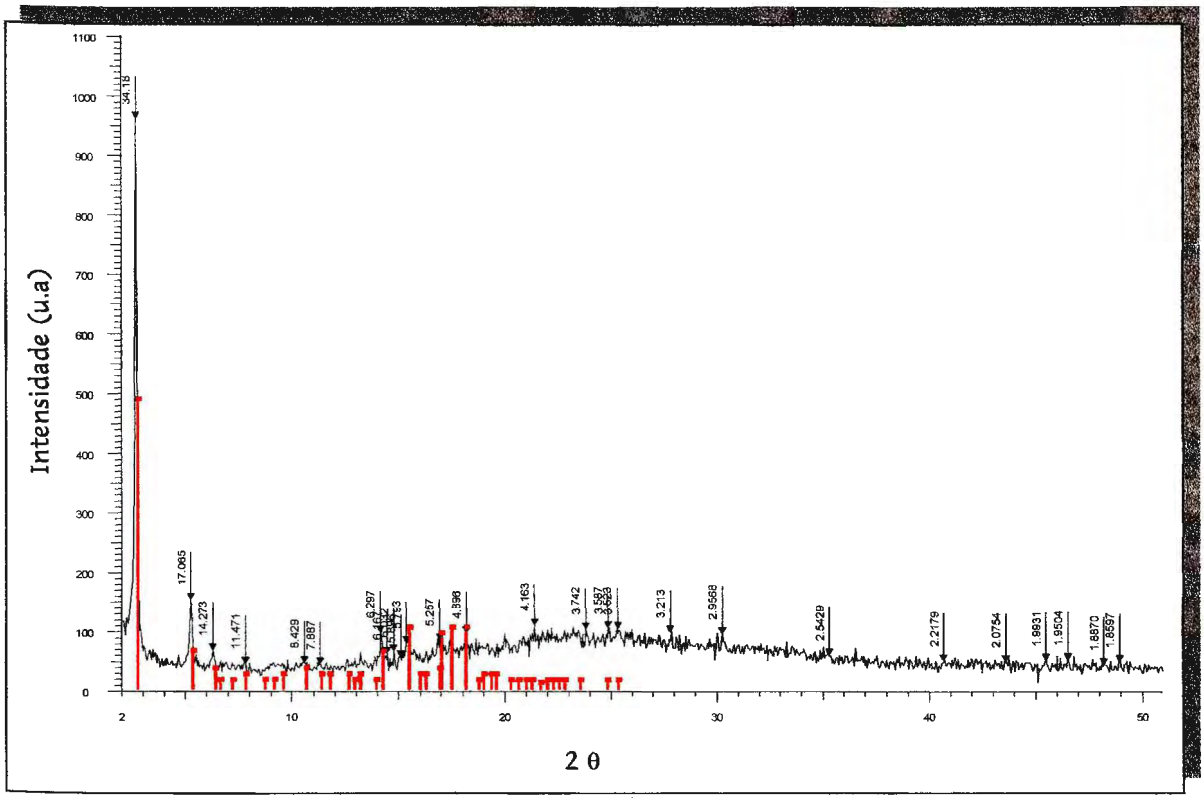

Figura II.19 - Difratograma de raios X do padrão de colesterol obtido pelo método do pó.

CAPÍTULO III

Material e Métodos

- Material:
  - Matérias Primas;
  - Reagentes Padrões.

- Métodos:
  - Amostragem;
  - Pré-tratamento;
  - Caracterização Química;
  - Estudo Termoanalítico

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. MATERIAL

III.1.1. Matérias Primas

Foram coletadas 122 amostras, sendo 61 de cálculos biliares e 61 de bile de pacientes submetidos a colecistectomia, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). O acesso à cavidade peritonal para obtenção do material foi adotado pelo cirurgião responsável pelo paciente, consistindo da laparotomia ou a vídeo laparoscopia.

Os pacientes foram informados no pré - operatório e consentiram em fornecer as amostras de seus cálculos biliares e bile para esse estudo.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário, pelo qual foi aprovado.

Todas as amostras coletadas receberam um código correspondente ao tipo de material, sexo do paciente e número por ordem de realização cirúrgica, como mostra a Tabela III.1.

Tabela III.1 - Interpretação dos códigos das amostras coletadas de cálculos biliares e bile humana

Código da amostra	Tipo do material	Sexo do paciente	Número do caso cirúrgico
SF1	S = cálculo biliar	F = feminino	1
BF1	B = bile	F = feminino	1
SM10	S = cálculo biliar	M = masculino	10
BM10	B = bile	M = masculino	10

III.1.2. Reagentes:

III.1.2.1. Padrões

Todos os compostos padrões que fazem parte da composição biliar, utilizados nesse estudo são da marca Sigma e apresentam a composição, fórmula molecular e purezas, conforme indicado na Tabela III.2

Tabela III.2 - Compostos padrões com a respectiva composição, fórmula molecular e percentagem de pureza.

Substâncias	Composição	Fórmula Molecular	Pureza (%)
Sais biliares	colato de sódio (~50%) deoxicolato de sódio (~50%)	$C_{24}H_{39}NaO_5$ $C_{24}H_{39}NaO_4$	99
Ácido cólico	-	$C_{24}H_{40}O_5$	98
Ácido deoxicólico	-	$C_{24}H_{40}O_4$	99
Ácido quenodeoxicólico	-	$C_{24}H_{40}O_4$	98
Ácido litocólico	-	$C_{24}H_{40}O_3$	97
Éster metílico de Ácido Cólico	-	$C_{25}H_{42}O_5$	97
Colesterol	-	$C_{27}H_{46}O$	96
Bilirrubina	Bilirrubira IXα (~88%) bilirrubira IIIα (~7%) bilirrubira XIIIα (~5%)	$C_{33}H_{36}N_4O_6$	99

III.1.2.2. Sintetizado:

O bilirrubinato de cálcio (fórmula molecular: $C_{33}H_{34}CaN_4O_6$), foi sintetizado, nos laboratórios LATIG segundo o método proposto por EDWARDS *et alii* (1958).

III.2. MÉTODOS

III.2.1. Metodologia de Amostragem:

No período de 05 de setembro de 1997 a 23 de junho de 1998, foram coletados os cálculos biliares (produto de colecistectomias) e bile (resíduo presente na vesícula, após sua retirada, no momento operatório), de 61 pacientes submetidos a colecistectomia pela equipe de cirurgiões do HU-USP, perfazendo um total de 122 amostras (61 de cálculos biliares e 61 de bile). No entanto, foram utilizadas somente 40 amostras de cálculos biliares e 40 de bile, devido à ocorrência de alguns problemas técnicos durante a coleta e o transporte.

As amostras de cálculos biliares foram coletadas em frascos de vidro, previamente descontaminados, para componentes químicos com água destilada e fervida a aproximadamente 100°C e secos em estufa a 200°C por 24 horas. As amostras de bile foram coletadas em tubos de ensaio esterilizados por autoclavagem. Após a coleta, todas as amostras foram conservadas e transportadas em gelo seco à temperatura de aproximadamente -88°C e, posteriormente, armazenadas em um congelador à temperatura de aproximadamente -27°C (HOLAN *et alii,* 1979), no Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito (LATIG) no Instituto de Química da USP.

III.2.2. Metodologia para o Pré-Tratamento das Amostras

III.2.2.1. Cálculos biliares

As 40 amostras de cálculos biliares foram descongeladas à temperatura ambiente e, posteriomente, colocadas para secar sob vácuo a 630 mmHg, por 3 dias em um dessecador contendo sílica gel. Em seguida, foram divididas ao meio, uma das partes foi pulverizada, utilizando um almofariz de

ágata e, a outra preservada para posterior estudo. Ambas as partes foram conservadas em dessecador sob vácuo, contendo sílica gel.

III.2.2.2. Bile

As 40 amostras de bile foram liofilizadas em um liofilizador marca LABCONCO, à temperatura de -40°C e vácuo em torno de 10 a 0,012 bar, num período de 2 a 10 horas e, posteriomente, armazenadas em um dessecador contendo sílica gel.

III.2.3. Métodos de Análise

A Figura III.1 mostra esquematicamente todas as técnicas empregadas no processo de caracterização das amostras de cálculos biliares e bile e, também, as técnicas de análise térmica utilizadas para o estudo termoanalítico. Os ítens que seguem este Fluxograma descreverão com detalhes toda a instrumentação e as respectivas metodologias usadas nestes processos.

III.2.3.1. Caracterização Química

III.2.3.1.1. Análise Elementar (A.E)

As amostras foram colocadas em cápsulas de estanho, utilizando uma massa em torno de 1 a 1,5 mg, e queimadas a temperatura de 925°C, em um volume medido de oxigênio isento de impurezas orgânicas à pressão constante, de forma que todo o carbono contido na amostra fosse liberado como gás carbônico, todo hidrogênio como água e todo o nitrogênio na forma de seus diversos óxidos, que em seguida foram reduzidos a N_2 em um tubo de redução. Os compostos voláteis foram separados em uma coluna cromatográfica e os teores de carbono, hidrogênio e oxigênio foram determinados por um detetor de condutividade térmica. Para essa determinação foi utilizado um equipamento de análise

elementar marca Perkin Elmer, modelo 2400 pertencente a Central Analítica do IQ-USP.

III.2.3.1.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram registrados na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1}, utilizando os espectrômetros da marca NICOLET, modelo MAGNA 550 da Oxiteno S/A Indústria e Comércio e da marca BOMEM, modelo MB 102 do Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito (LATIG). Os espectros foram obtidos utilizando a metodologia de pastilha, as quais foram formadas com aproximadamente 1% de amostra diluída em KBr, procedente da Merck com 99% de pureza.

III.2.3.1.3. Difratometria de Raios X

Os difratogramas de raios X foram obtidos no Laboratório de Difração de raios X do Instituto de Geociências da USP de São Paulo, pelo método do pó utilizando um difratômetro do tipo Bragg-Brentano, marca Siemens, modelo D5000. Para as interpretações foi usado o banco de dados ICDD-PDF *(Powder Diffracton File)*. Para essas medidas trabalhou-se com aproximadamente 1 mg de amostra suportada em lamínulas de vidro fosco, submetidas a 40 kV e 40 mA, fornecendo radiação CuKα e λ = 1,542 Å, com exposição de 3° a 65°(2θ).

III.2.3.2. Estudo Termoanalítico

Todos os experimentos referentes a esse estudo foram executados pelos equipamentos de análise térmica pertencentes ao LATIG. As especificações dos mesmos e as condições de trabalho estão apresentadas na Figura III.2 . Os itens que seguem descreverão com detalhes as metodologias empregadas na obtenção dos dados termoanalíticos.

III.2.3.2.1. Termogravimetria (TG)/Termogravimetria Derivada (DTG):

Nas investigações termogravimétricas foram empregadas duas termobalanças, modelos TGA-50 e TGA-51H, ambas marca SHIMADZU.

A detecção de variação de massa dessas termobalanças é de ± 1 μg e podem operar com capacidade máxima de ≈200 mg para o TGA-50 e ≈2000 mg para o TGA-51H e fornos que permitem aquecimentos da temperatura ambiente até 1000°C e 1500°C, respectivamente.

Neste trabalho, a Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG) foram empregadas para avaliar a estabilidade térmica e decomposição térmica das amostras de cálculos biliares e bile, assim como, dos compostos padrões que fazem parte do processo metabólico biliar. As curvas TG/DTG foram obtidas sob atmosfera dinâmica de ar, com vazão de 50 mL min^{-1}, da temperatura ambiente até 900°C, com razão de aquecimento (β) de 10 °C min^{-1}, utilizando massa de amostra em torno de 3-4 mg em cadinho de platina. Destaca-se que, apenas um ensaio termogravimétrico para a amostra de cálculo biliar SF15, foi realizado sob atmosfera dinâmica mista (ar + CO_2), com vazão de 100 mL min^{-1} e uma programação de aquecimento, com razão de aquecimento (β) de 10 °C min^{-1} da temperatura ambiente até 1200°C, e uma programação de resfriamento, com razão de -10 °C min^{-1} até 500°C, utilizando massa de amostra em torno de 10-15 mg, também, em cadinho de platina. Para o tratamento dos dados usou-se o programa *TASYS-50* (versão 1,14) instalado na estação de dados do sistema.

Antes da execução dos experimentos, as condições da instrumentação foram verificadas obtendo-se curvas TG/DTG para uma amostra padrão de $CaC_2O_4.H_2O$ e ainda a curva TG do cadinho vazio (curva em branco) para correção da linha base. A calibração da instrumentação foi executada de acordo com o procedimento do fabricante encontrado nos manuais de instrução (SHIMADZU CORPORATION, 1989, 1995[a]).

III.2.3.2.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A célula DSC-50 marca SHIMADZU permite avaliar o comportamento térmico de uma amostra com base na temperatura ambiente até 725°C. Neste trabalho, o DSC foi empregado para avaliar a estabilidade e decomposição térmica das amostras de cálculos biliares e bile, assim como, dos compostos padrões que fazem parte do processo metabólico biliar e, também, dos eventos de origem física que não estão associados à perda de massa. Para isso, utilizaram-se cápsulas de alumínio parcialmente fechadas, atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}), intervalo da temperatura ambiente a 550°C, massa de amostra entre 1,5 a 2,0 mg e razão de aquecimento (β) de 10 °C min^{-1}. Para o tratamento dos dados, usou-se o programa *TASYS-50* (versão 1,14) instalado na estação de dados do sistema.

O equipamento foi previamente calibrado usando índio metálico de pureza 99,99%, com ponto de fusão em 156,6°C e ΔH_s^l de 28,59 J/g (entalpia de fusão) e o zinco metálico de pureza 99,99%, com ponto de fusão em 419,6°C e ΔH_s^l de 108,0 J/g. Foram calculados os fatores de correção conforme procedimento e especificação do fabricante (SHIMADZU CORPORATION, 1989).

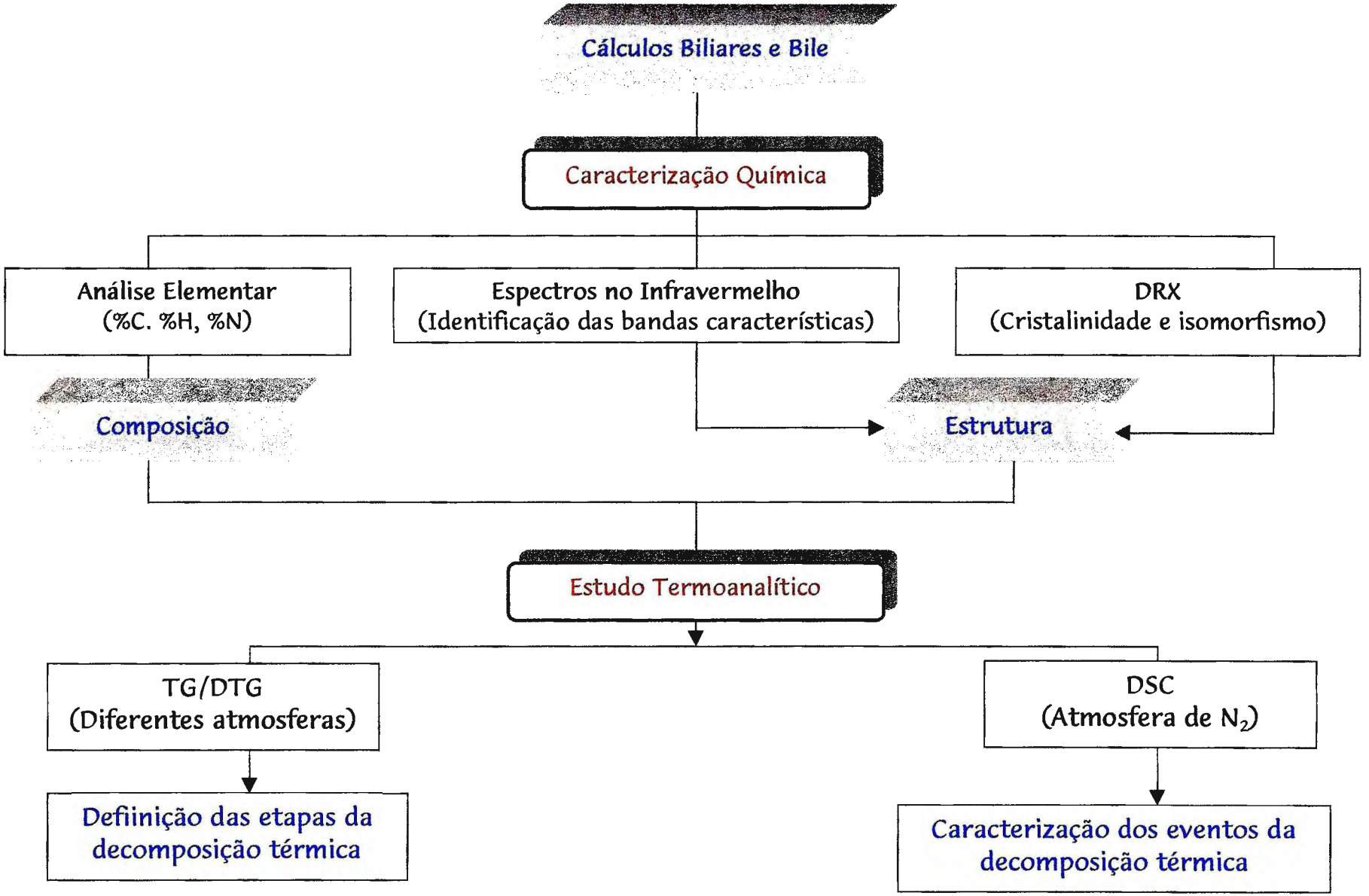

Figura III.1 - Técnicas utilizadas na caracterização do material em estudo com suas respectivas finalidades.

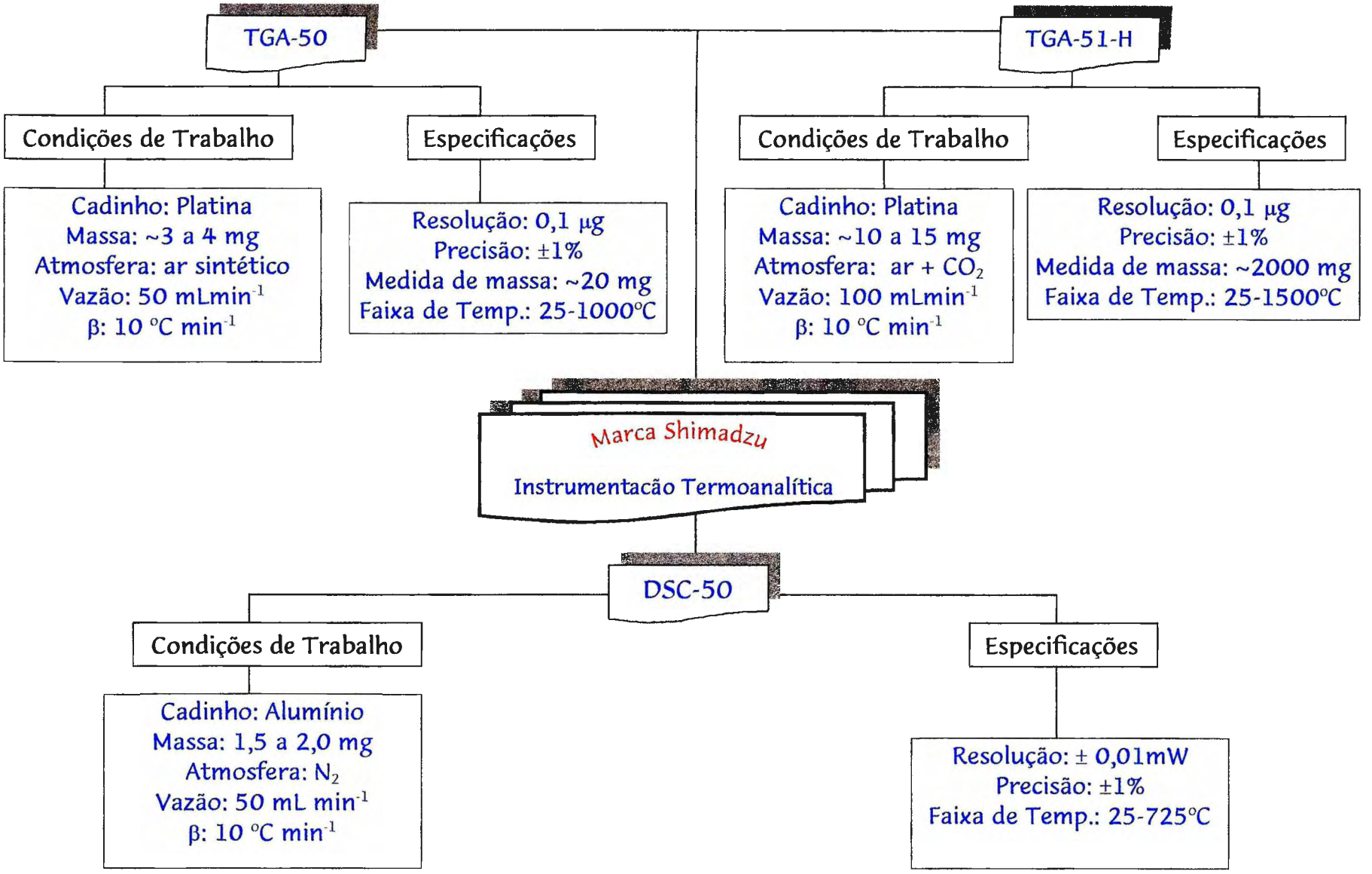

Figura III.2 - Instrumentação termoanalítica utilizada no processo de caracterização do material.

CAPÍTULO IV

- Resultados

e

- Discussão

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

IV.1.1. Aspectos Gerais sobre as Amostras de Cálculos Biliares e Bile

A Tabela IV.1, evidencia a idade do paciente bem como alguns aspectos importantes das amostras de cálculos biliares e bile. Nesse relato deve-se observar que, a maior incidência de casos de colelitíase ocorre em pacientes do sexo feminino com idades acima de 30 anos, isto porque os 40 casos dos pacientes colecistectomizados, 75% eram do sexo feminino e 25% do masculino, corroborando com os dados da literatura (SAMPLINER *et alii*, 1970). No entanto, a classificação realizada neste trabalho discorda com a de Sutor e Wooley, já mencionada na Tabela II.3, ítem II.1 do capítulo 2, pois os aspectos físicos dos cálculos biliares, Figura IV.1, não são condizentes com a composição química daqueles autores (SUTOR & WOOLEY, 1971).

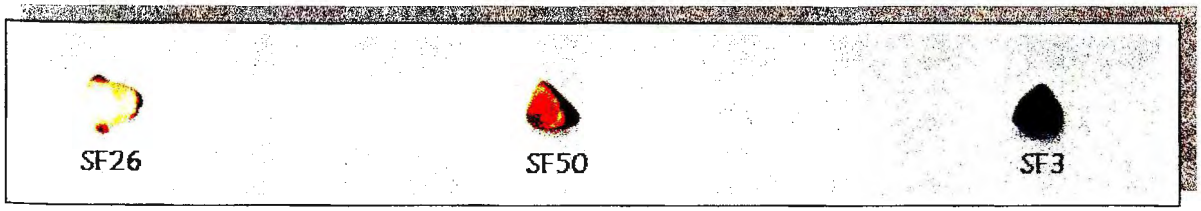

Figura IV.1 - Representação fotográfica dos cálculos biliares pertencentes ao grupo A com colorações distintas.

Acresce-se ainda a grande incidência de cálculos biliares pertencentes ao grupo A. Dos 100% de cálculos utilizados, 57,5% fazem parte desse grupo; 17,5% do grupo B; 7,5% do grupo C; 5,0% do grupo D; 2,5% do grupo E; 5,0% do grupo F; 2,5% do grupo G e 2,5% do grupo H, como mostra a Tabela IV.1.

Tabela IV.1 - Aspectos físicos das amostras de cálculos biliares e bile, idade dos pacientes e incidência dos cálculos biliares nos grupos.

Grupos	Idade (anos)	* Amostra de cálculos biliares e bile	Aspecto Físico		Incidência (%)
			Cálculo Biliar	Bile	
			Cor	Cor	
A	60	SF3 / BF3	Preto	Verde amarelada	57,5
	32	SF4 / BF4	Marrom	Verde amarelada	
	52	SF7 / BF7	Marrom	Amarela acastanhada	
	59	SF8 / BF8	Marfim	Amarela acastanhada	
	60	SF9 / BF9	Marrom	Amarela esverdeada	
	50	SM10 / BM10	Marrom	Amarela acastanhada	
	55	SF12 / BF12	Marrom	Verde musgo	
	51	SM13 / BM13	Marfim	Amarela acastanhada	
	37	SF14 / BF14	Marfim	Marrom avermelhada	
	71	SF16 / BF16	Marrom	Verde acastanhada	
	42	SM18 / BM18	Marrom	Amarela acastanhada	
	51	SF26 / BF26	Marfim	Amarela acastanhada	
	69	SF27 / BF27	Marrom	Amarela purulenta	
	29	SF32 / BF32	Marrom	Verde musgo	
	58	SF36 / BF36	Marrom	Verde musgo	
	50	SF40 / BF40	Marrom	Amarela purulenta	
	51	SF41 / BF41	Marrom	Amarelo ouro	
	19	SF45 / BF45	Marfim	Amarelo ouro	
	24	SF46 / BF46	Marfim	Verde musgo	
	54	SF50 / BF50	Marrom	Verde musgo	
	55	SF53 / BF53	Marrom	Amarelo ouro	
	45	SF55 / BF55	Marrom	Vermelha	
	84	SF57 / BF57	Marrom	Amarela acastanhada	
B	51	SF1 / BF1	Preto	Verde musgo	17,5
	30	SF5 / BF5	Marfim	Verde musgo	
	34	SF17 / BF17	Marrom	Amarela acastanhada	
	64	SM22 / BM22	Marrom	Amarela acastanhada	
	55	SF25 / BF25	Marrom	Verde musgo	
	56	SF35 / BF35	Marfim	Amarela ouro	
	51	SM51 / BM51	Preto	Amarela acastanhada	
C	52	SF37 / BF37	Marrom	Verde amarelada	7,5
	46	SF59 / BF59	Marrom	Amarela	
	62	SM58 / BM58	Preto	Verde musgo	
D	33	SM31 / BM31	Preto	Amarela acastanhada	5,0
	35	SM56 / BM56	Preto	Amarela acastanhada	
E	43	SF54 / BF54	Marrom	Amarela acastanhada	2,5
F	29	SM43 / BM43	Preto	Amarelo ouro	5,0
	87	SF47 / BF47	Preto	Amarela acastanhada	
G	25	SM44 / BM44	Preto	Verde musgo	2,5
H	74	SF15 / BF15	Preto	Verde musgo	2,5

* Códigos das amostras: por exemplo, SF1 (S = cálculo biliar; F = feminino; 1= primeiro caso) e BM10 (B = bile; M = masculino; 10 = décimo caso).

Durante as coletas foram observados, ainda, os diferentes tamanhos dos cálculos biliares coletados, que variavam, consideravelmente, de micropartículas à partículas com 37 mm de comprimento, Figura IV.2. Bem como, a diversificação de coloração da bile no mesmo grupo, Figura IV.3.

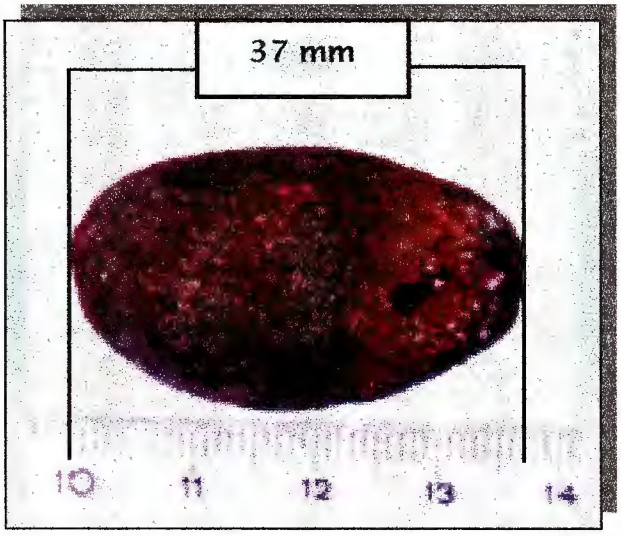

Figura IV.2 - Representação fotográfica de um cálculo biliar com 37 mm de comprimento.

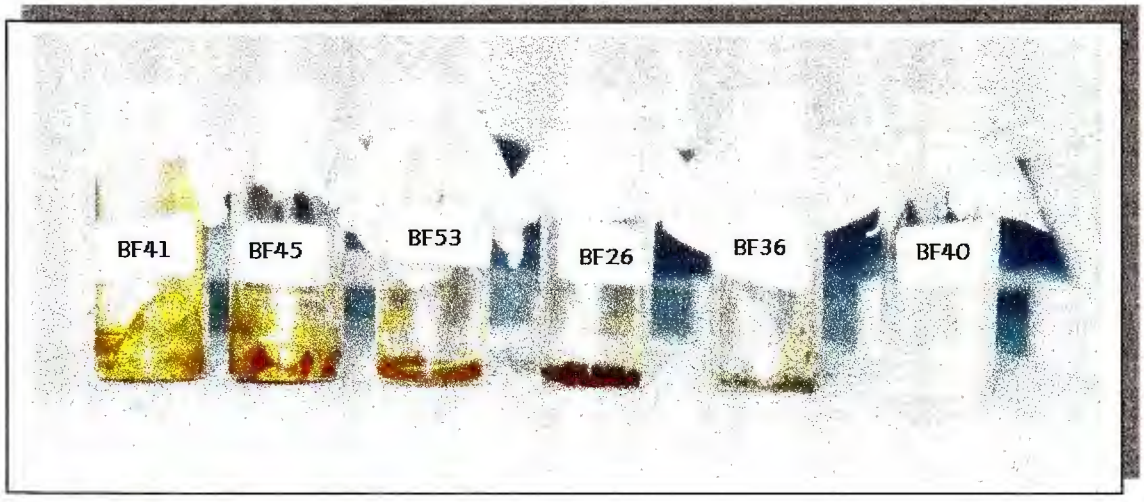

Figura IV.3 - Representação fotográfica das amostras de bile liofilizadas, pertencentes ao grupo A.

IV.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

IV.2.1. Análise Elementar (A.E)

Comparando-se os teores de carbono (%C), hidrogênio (%H) e nitrogênio (%N) obtidos pela análise elementar das amostras de cálculos biliares e dos padrões dos compostos que fazem parte do processo metabólico biliar, Tabela IV.2 e Tabela IV.4, foi possível classificar os cálculos biliares em oito grupos distintos.

Na Tabela IV.2 pode-se observar que, nas amostras do grupo A os teores de carbono (79 a 83,10%) e hidrogênio (11 a 11,92%) eram condizentes com aqueles do padrão de colesterol [carbono (83,89%) e hidrogênio (11,78%)], Tabela IV.4. No entanto, os teores de nitrogênio, para algumas amostras de cálculos biliares pertencentes aquele grupo A, apresentaVam valores acima de 0,3% (considerado como limite de erro da instrumentação para a determinação dos teores de C, H e N). Deste modo, comprova-se que além do colesterol, essas amostras têm, na sua composição química, outra espécie que contém nitrogênio em sua constituição. Idêntica composição apresentam as amostras do grupo B [carbono (66,67 a 78,81%) e hidrogênio (9,06 a 11,10%)] e C [carbono (66,67 a 78,81%) e hidrogênio (9,06 a 11,10%)], embora apresentem teores de carbono um pouco abaixo da faixa evidenciada no padrão de colesterol, apontado na Tabela IV.4, apresentam o mesmo na sua composição. Isto foi confirmado pelos espectros de absorção na região do infravermelho, Figura IV.15 e IV.17, pelos difratogramas de raios X, Figura IV.30 e IV.31, pelos perfis das curvas TG/DTG, Figura IV.38 e IV.39, e pelas curvas DSC que apresentam um evento endotérmico característico do processo de fusão do colesterol a aproximadamente 147°C, Figura IV.40 e IV.41. As amostras pertencentes aos grupos D, E, F, G, e H, mostram teores de carbono que variam entre 59,46 e 19,14%. Esta diminuição sugere a presença significativa de material inorgânico na composição desses cálculos biliares, confirmado pelas curvas TG/DTG quando se observam os teores dos produtos sólidos provenientes do processo de decomposição térmica,

ocorrido sob atmosfera dinâmica de ar, isolados na temperatura de 900°C, Tabela IV.14.

TABELA IV.2 - Resultados de análise elementar (CHN) das amostras de cálculos biliares.

Grupos	Amostra	%C	%H	%N
A	SF3	81,84	11,47	0,37
	SF4	81,44	11,66	0,28
	SF7	81,99	11,74	0,38
	SF8	82,89	11,87	0,18
	SF9	83,04	11,65	0,33
	SM10	81,36	11,28	0,59
	SF12	82,98	11,74	0,56
	SM13	81,60	11,13	0,58
	SF14	82,80	11,60	1,07
	SF16	80,16	11,13	0,42
	SM18	81,61	11,34	0,33
	SF26	82,69	11,72	0,35
	SF27	83,10	11,87	0,31
	SF32	82,24	11,68	0,56
	SF36	82,77	11,58	0,30
	SF40	81,16	11,52	0,93
	SF41	82,62	11,73	0,48
	SF45	82,33	11,75	0,43
	SF46	82,44	11,81	0,15
	SF50	81,19	11,87	0,19
	SF53	81,23	11,92	0,44
	SF55	80,27	11,67	0,24
	SF57	79,55	11,58	0,95
B	SF1	72,52	9,1	1,30
	SF5	76,10	10,80	0,35
	SF17	66,67	9,06	0,84
	SM22	76,28	10,45	0,42
	SF25	66,74	9,14	0,29
	SF35	75,45	10,65	0,30
	SM51	76,69	10,81	1,28
C	SF37	73,16	10,34	1,64
	SF59	77,43	11,66	0,67
	SM58	74,99	10,53	2,49
D	SM31	53,62	6,92	6,43
	SM56	53,93	6,42	6,66
E	SF54	54,59	7,38	6,76
F	SM43	57,65	6,71	5,77
	SF47	59,46	7,36	6,02
G	SM44	42,10	5,97	0,36
H	SF15	19,14	1,55	1,66

TABELA IV.3 - Resultados de análise elementar (CHN) das amostras de bile.

Grupos	Amostra	%C	%H	%N
A	BF3	51,64	7,72	2,46
	BF4	62,28	9,38	2,59
	BF7	55,51	8,20	4,03
	BF8	53,71	8,27	2,96
	BF9	55,83	8,45	2,53
	BM10	58,26	8,54	3,26
	BF12	53,76	8,07	4,11
	BM13	33,52	4,92	6,56
	BF14	35,92	5,25	9,41
	BF16	53,22	7,98	5,59
	BM18	58,76	8,83	3,44
	BF26	51,42	7,38	3,09
	BF27	48,79	7,18	9,55
	BF32	54,17	7,92	5,07
	BF36	51,53	7,88	2,27
	BF39	56,42	8,60	3,18
	BF40	56,02	8,45	2,85
	BF41	58,62	8,78	3,65
	BF45	35,08	5,19	9,55
	BF46	43,97	6,39	4,12
	BF50	54,90	8,05	2,54
	BF53	58,46	8,65	2,47
	BF55	41,64	6,14	1,52
	BF57	24,78	3,21	4,91
B	BF1	55,71	8,45	2,69
	BF5	58,39	8,65	3,90
	BF17	50,07	7,44	3,04
	BM22	61,19	9,30	2,81
	BF25	35,75	5,23	3,98
	BF35	57,47	8,76	3,06
	BM51	45,07	6,62	5,36
C	BF37	58,04	8,83	3,64
	BM58	47,03	7,19	7,63
	BF59	34,19	4,87	8,27
D	BM31	60,94	8,90	2,76
	BM56	57,46	8,79	3,19
E	BF54	37,29	5,51	3,62
F	BM43	44,09	6,33	8,95
	BF47	48,09	7,16	7,33
G	BM44	60,63	9,09	2,94
H	BF15	57,16	8,44	2,63

TABELA IV.4 - Resultados de análise elementar (CHN) dos padrões dos saís e ácidos biliares, 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
Sais biliares	Colato de sódio	$C_{24}H_{39}NaO_5$	66,95		9,13			
	Deoxicolato de sódio	$C_{24}H_{39}NaO_5$	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
Ác ido 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	1,06	-	0,12
Ác.ido litocólico		$C_{24}H_{40}O_3$	76,55	76,84	10,71	10,70	-	0,04
Éster metílico de ácido cólico		$C_{25}H_{42}O_5$	71,05	70,77	10,02	9,83	-	0,17

A comparação dos resultados dos teores de C, H e N dos cálculos biliares e das biles de mesmos pacientes, Tabelas IV.2 e IV.3, respectivamente, evidenciou a distinção da classificação desses dois tipos de matrizes. Assim dois cálculos, amostras SF9 e SF27, de mesma composição química, ou seja, tipicamente de colesterol, apresentam biles, BF9 e BF27, quimicamente diferentes. No entanto, as amostras SF9 e SF1, quimicamente diferentes, apresentam biles, BF9 e BF1, com composição química semelhantes.

IV.2.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR):

Neste trabalho, a espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi usada para adicionar informações complementares ao estudo da caracterização dos cálculos biliares e bile. Com base nos resultados foi possível

identificar a composição química desses materiais, utilizando a caracterização dos padrões dos principais compostos que fazem parte do processo metabólico biliar, dos quais podemos destacar: o colesterol; os ácidos cólico, quenodeoxicólico, deoxicólico e litocólico; éster metílico de ácido cólico; os sais biliares (colato de sódio e deoxicolato de sódio); a bilirrubina e o bilirrubinato de cálcio. Suas fórmulas estruturais planas e as interpretações dos espectros de absorção na região do infravermelho serão relatadas com base na literatura (NAKANISHI, 1964; NYQUIST & KAGEL, 1971; POUCHERT, 1975).

IV.2.2.1. COMPOSTOS PADRÕES QUE FAZEM PARTE DO PROCESSO METABÓLICO DOS PIGMENTOS BILIARES:

IV.2.2.1.1. COLESTEROL:

A Figura IV.4, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão de colesterol. A Tabela IV.5, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto, Figura IV.5.

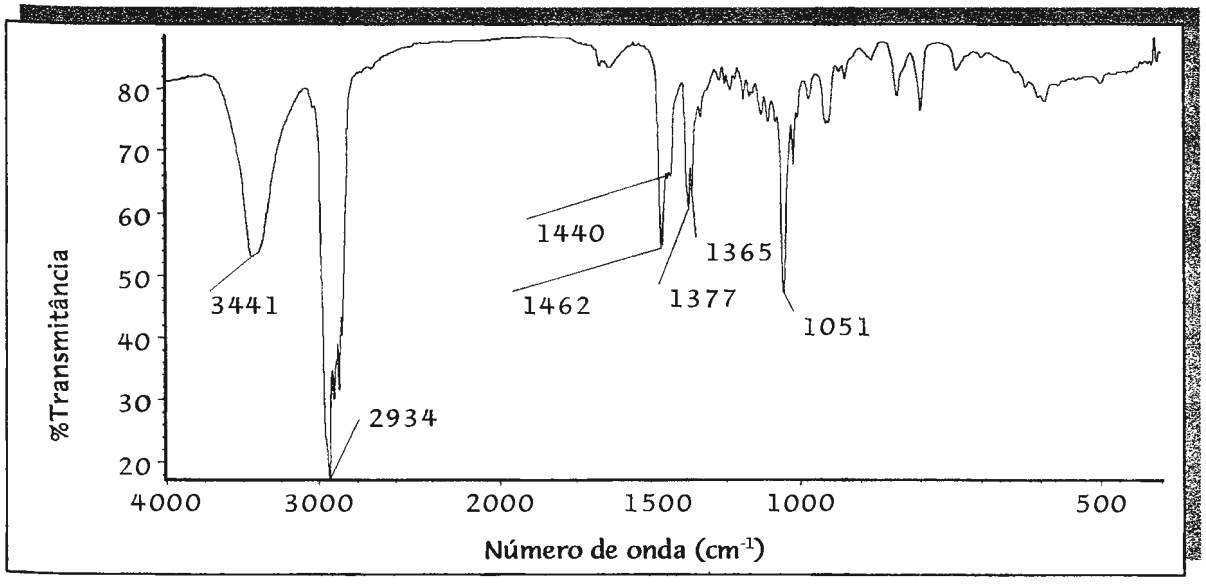

Figura IV.4 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão de colesterol.

Tabela IV.5 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão de colesterol e suas atribuições.

Compostos	N° de onda (cm^{-1})	Atribuições
Colesterol	3441	ν(OH) alcoólica
	2934	ν(C-H)
	1462 e 1440	δ(CH2 e CH3)
	1377 e 1365	δ(CH3) geminal
	1051	ν(C-OH) na posição 3α

onde: ν = estiramento; δ = deformação

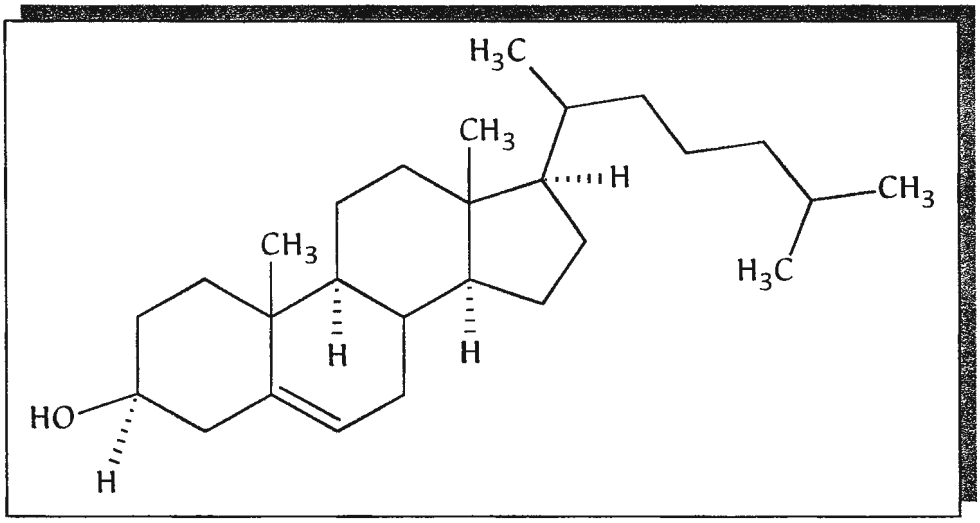

Figura IV.5- Fórmula estrutural plana do colesterol.

IV.2.2.1.2. ÁCIDO CÓLICO:

A Figura IV.6, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão do ácido cólico. A Tabela IV.6, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto, Figura IV.7.

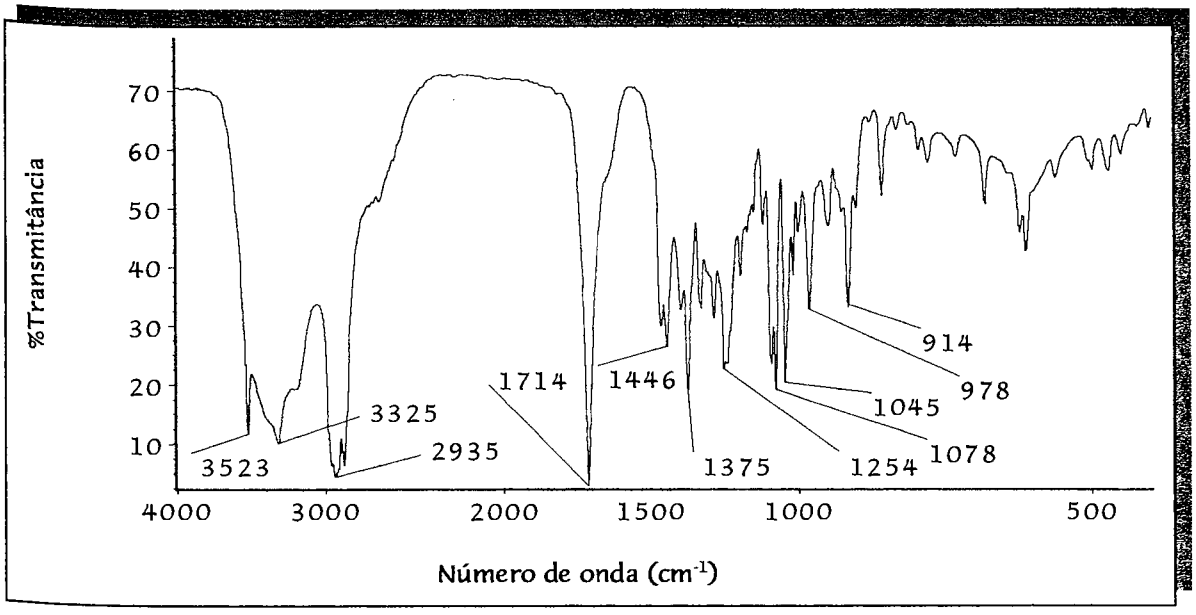

Figura IV.6 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido cólico.

Tabela IV.6 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido cólico e suas atribuições.

Compostos	N° de onda (cm^{-1})	Atribuições
Ácido cólico	3523 e 3325	ν(OH) alcoólica
	~ 3600 à 2300	ν(OH) do ácido carboxílico dimerizado
	1714	ν(C=O) de ácido dimerizado
	1446	δ(CH2 e CH3)
	1375	δ(CH3)
	1254	ν(C-O) da carbonila
	1078	ν(C-OH) na posição 12α
	1045	ν(C-OH) na posição 3α
	978	ν(C-OH) na posição 7α
	914	δ(OH) fora do plano ligado à C=O

onde: ν = estiramento; δ = deformação

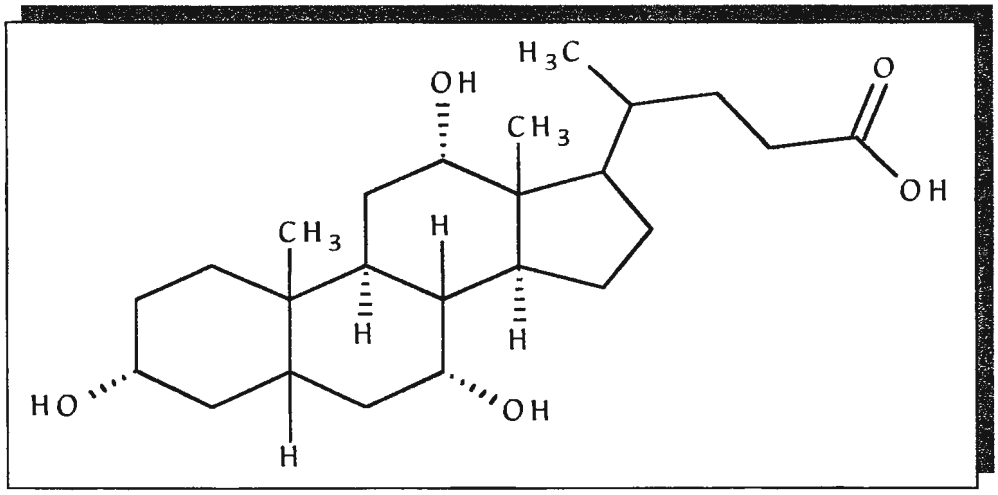

Figura IV.7 - Fórmula estrutural plana do ácido cólico.

IV.2.2.1.3. ÁCIDO DEOXICÓLICO:

A Figura IV.8, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão do ácido deoxicólico. A Tabela IV.7, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto, Figura IV.9.

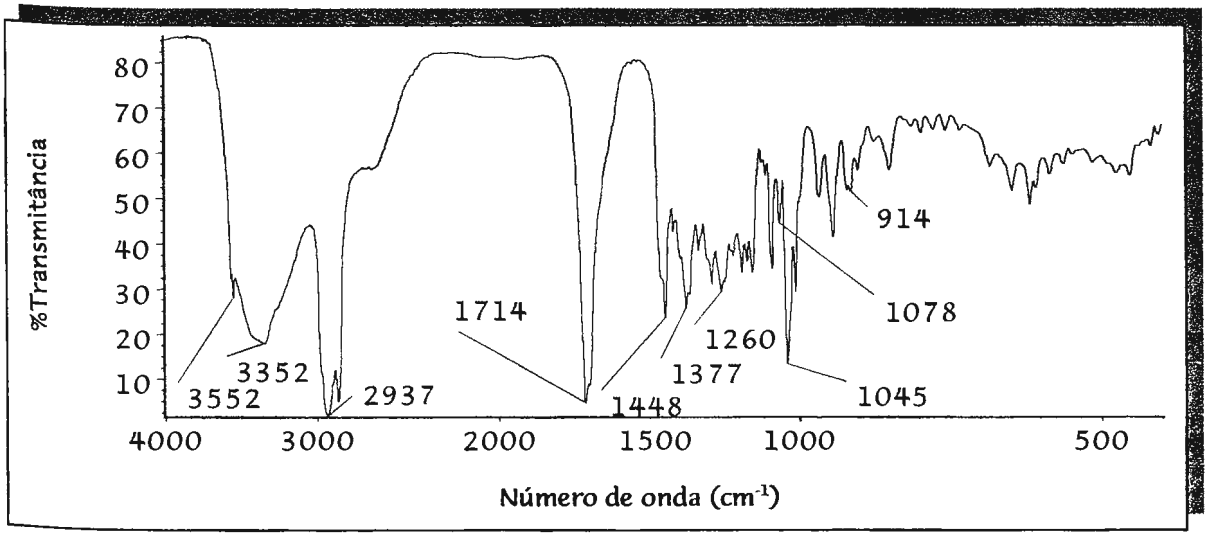

Figura IV.8 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido deoxicólico.

Tabela IV.7 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido deoxicólico e suas atribuições.

Compostos	N° de onda (cm^{-1})	Atribuições
Ácido deoxicólico	3552 e 3352	ν(OH) alcoólica
	~ 3600 à 2300	ν(OH) do ácido carboxílico dimerizado
	1714	ν(C=O) de ácido dimerizado
	1448	δ(CH2 e CH3)
	1377	δ(CH3)
	1260	ν(C-O) da carbonila
	1078	ν(C-OH) na posição 12α
	1045	ν(C-OH) na posição 3α
	914	δ(OH) fora do plano ligada à C=O

onde: ν = estiramento; δ = deformação

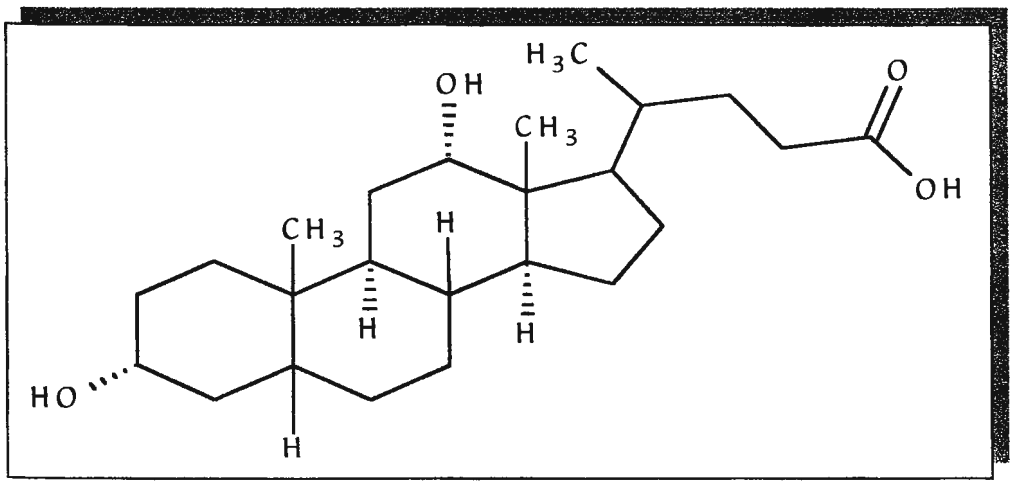

Figura IV.9 - Fórmula estrutural plana do ácido deoxicólico.

IV.2.2.1.4. ÁCIDO QUENODEOXICÓLICO:

A Figura IV.10, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão do ácido quenodeoxicólico. A Tabela IV.8, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto, Figura IV.11.

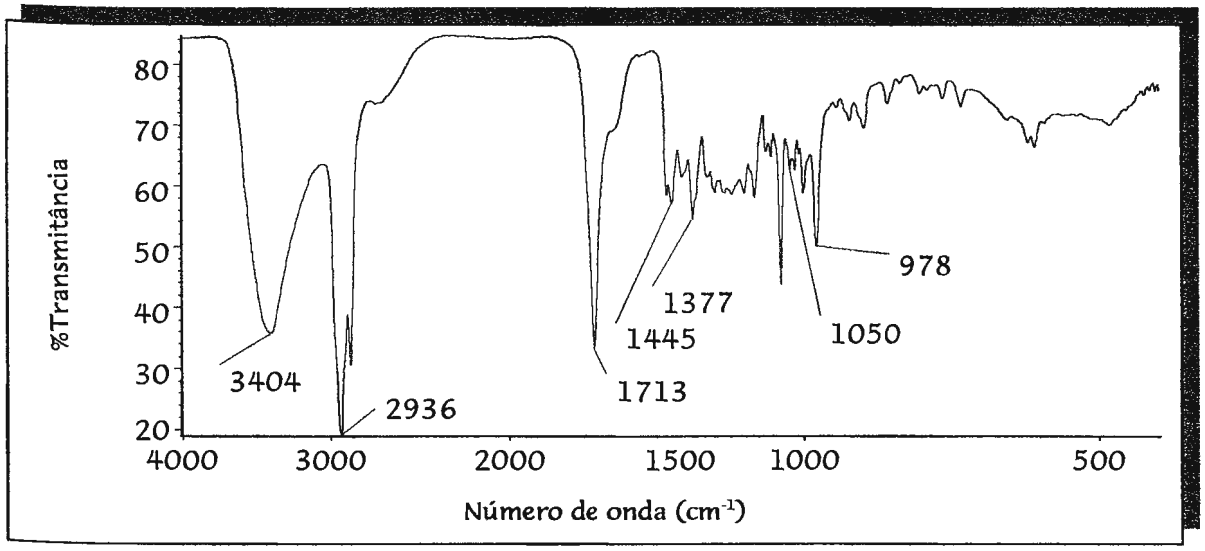

Figura IV.10 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido quenodeoxicólico.

Tabela IV.8 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido quenodeoxicólico e suas atribuições.

Compostos	N° de onda (cm^{-1})	Atribuições
Ácido quenodeoxicólico	3404	ν(OH) alcoólica
	~ 3600 à 2300	ν(OH) do ácido carboxílico dimerizado
	1713	ν(C=O) de ácido dimerizado
	1445	δ(CH2 e CH3)
	1377	δ(CH3)
	1050	ν(C-OH) na posição 3α
	978	ν(C-OH) na posição 7α

onde: ν = estiramento; δ = deformação

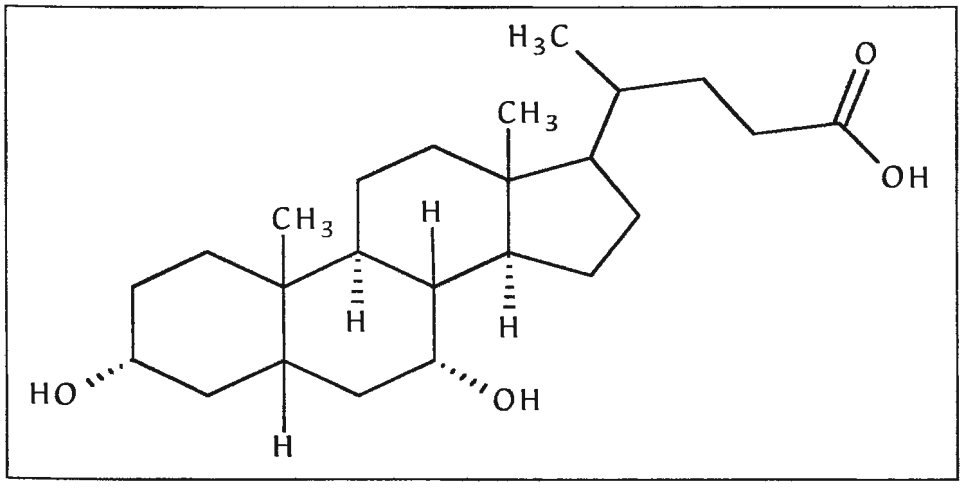

Figura IV.11 - Fórmula estrutural plana do ácido quenodeoxicólico.

IV.2.2.1.5. ÁCIDO LITOCÓLICO:

A Figura IV.12, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão do ácido litocólico. A Tabela IV.9, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto, Figura IV.13.

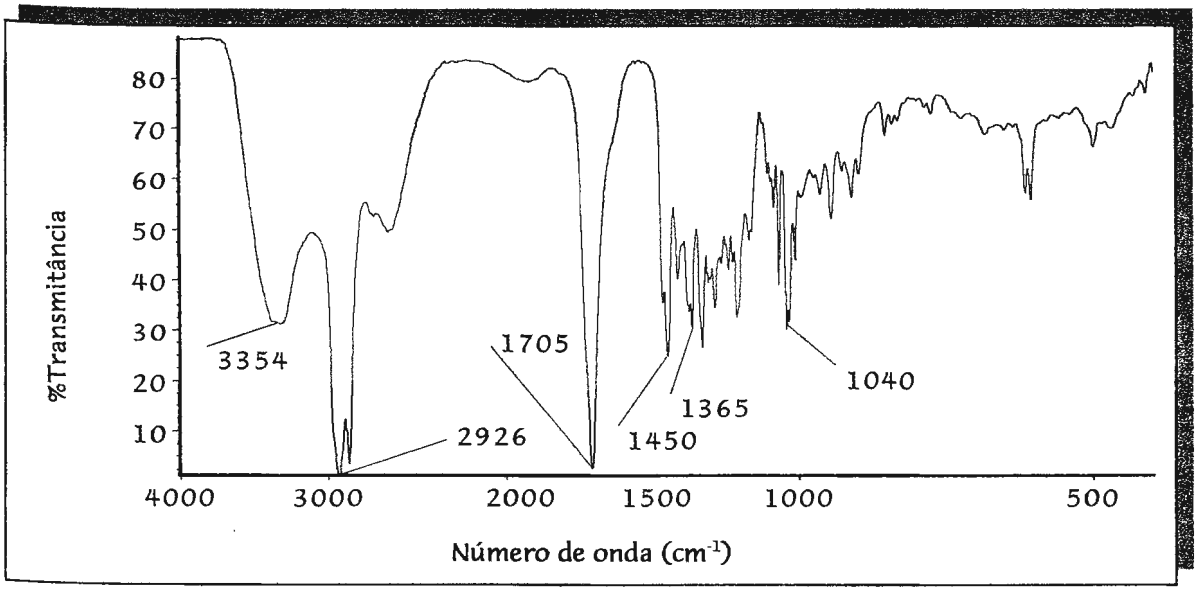

Figura IV.12 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido litocólico.

Tabela IV.9 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão do ácido litocólico e suas atribuições.

Compostos	N° de onda (cm^{-1})	Atribuições
Ácido litocólico	3354	ν(OH) alcoólica
	~ 3600 à 2300	ν(OH) do ácido carboxílico dimerizado
	1705	ν(C=O) de ácido dimerizado
	1450	δ(CH2 e CH3)
	1365	δ(CH3)
	1040	ν(C-OH) na posição 3α

onde: ν = estiramento; δ = deformação

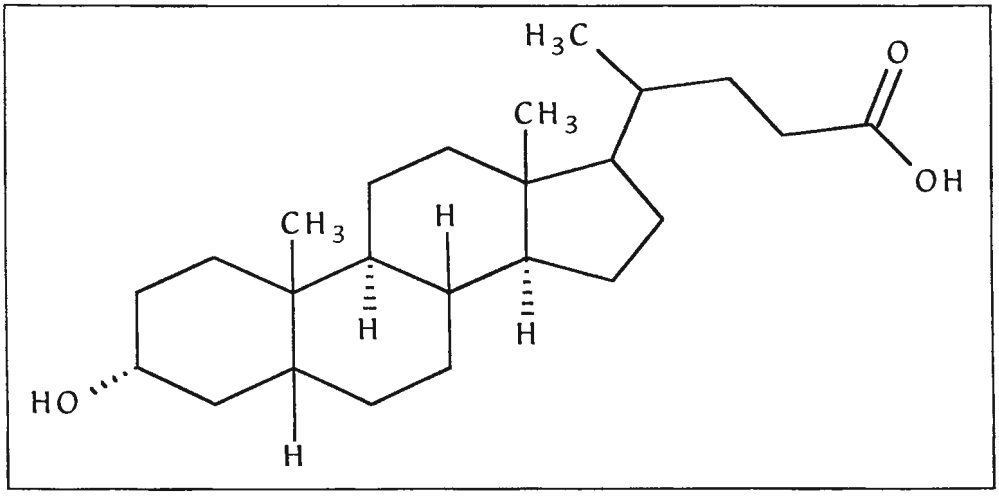

Figura IV.13 - Fórmula estrutural plana do ácido litocólico.

IV.2.2.1.6. ÉSTER METÍLICO DE ÁCIDO CÓLICO:

A Figura IV.14, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão do éster metílico de ácido cólico. A Tabela IV.10, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto, Figura IV.15.

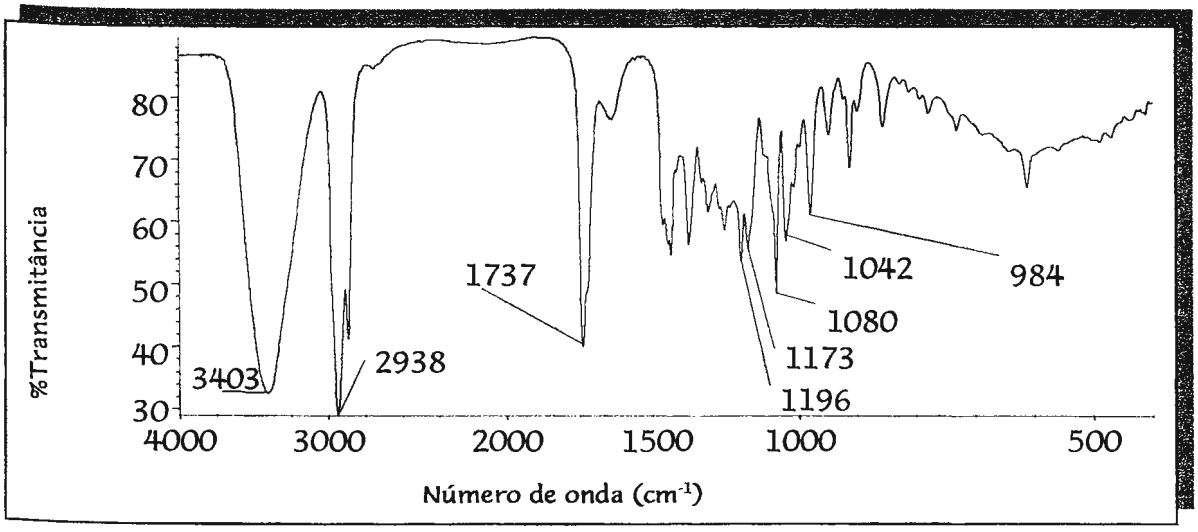

Figura IV.14 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do éster metílico de ácido cólico.

Tabela IV.10 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão do éster metílico de ácido cólico e suas atribuições.

Compostos	Nº de onda (cm^{-1})	Atribuições
Éster metílico de ácido cólico	3403	ν(OH) alcoólica
	1737	ν(C=OO-C)
	1196	ν(C-O-C) do éster
	1173	
	1080	ν(C-OH) na posição 12α
	1042	ν(C-OH) na posição 3α
	984	ν(C-OH) na posição 7α

onde: ν = estiramento; δ = deformação

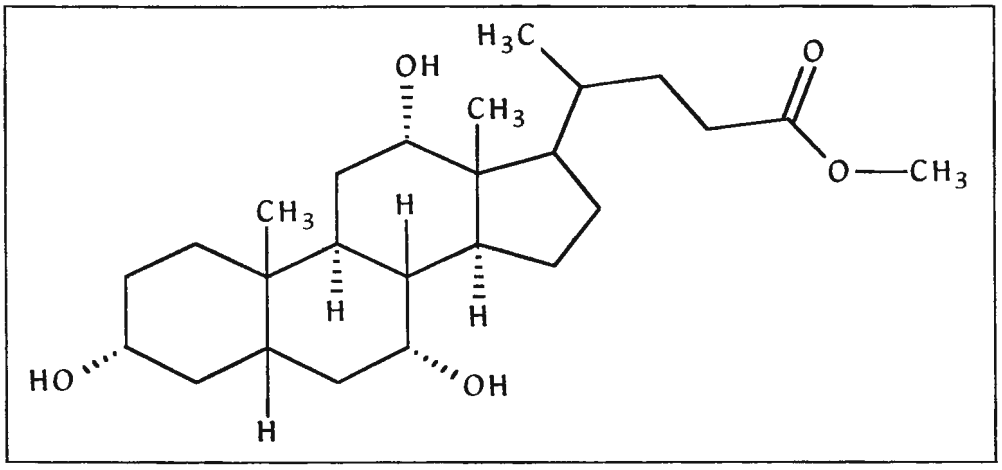

Figura IV.15 - Fórmula estrutural plana do éster metílico de ácido cólico.

IV.2.2.1.7. SAIS BILIARES (COLATO DE SÓDIO + DEOXICOLATO DE SÓDIO):

A Figura IV.16, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão dos sais biliares. A Tabela IV.11, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana dos referidos compostos, Figura IV.17 e Figura IV.18.

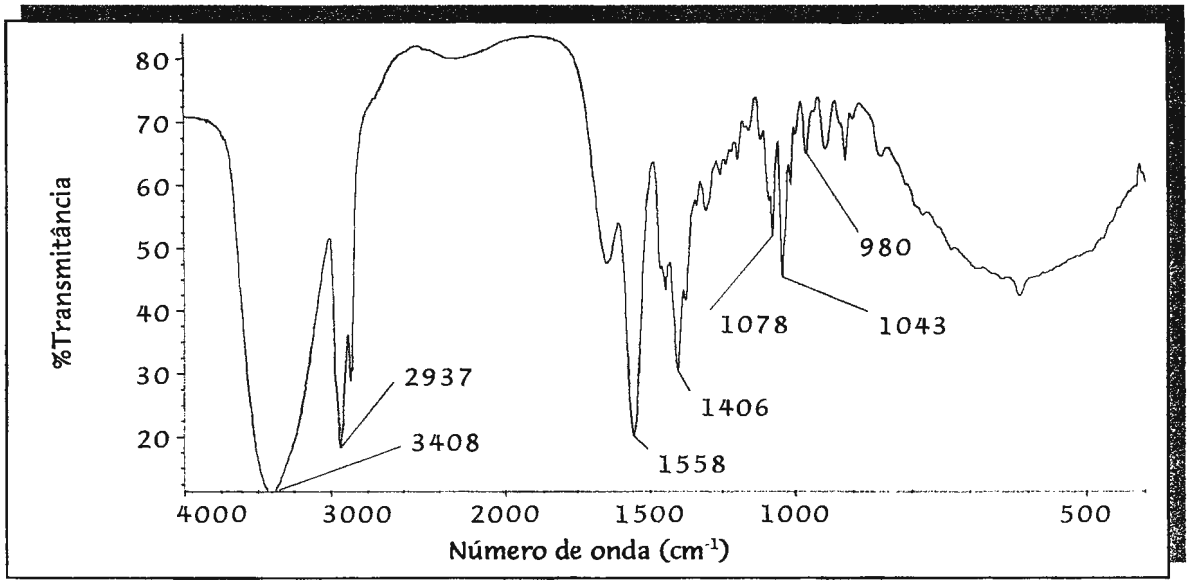

Figura IV.16 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão dos sais biliares.

Tabela IV.11 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão dos sais biliares e suas atribuições.

Compostos	N° de onda (cm^{-1})	Atribuições
Sais biliares (colato de sódio + deoxicolato de sódio)	3408	ν(OH) alcoólica
	1558	$\nu(COO^{-}Me^{+})$
	1406	$\nu(COO^{-}Me^{+})$
	1078	ν(COH) na posição 12α
	1043	ν(COH) na posição 3α
	980	ν(COH) na posição 7α

onde: ν = estiramento; δ = deformação

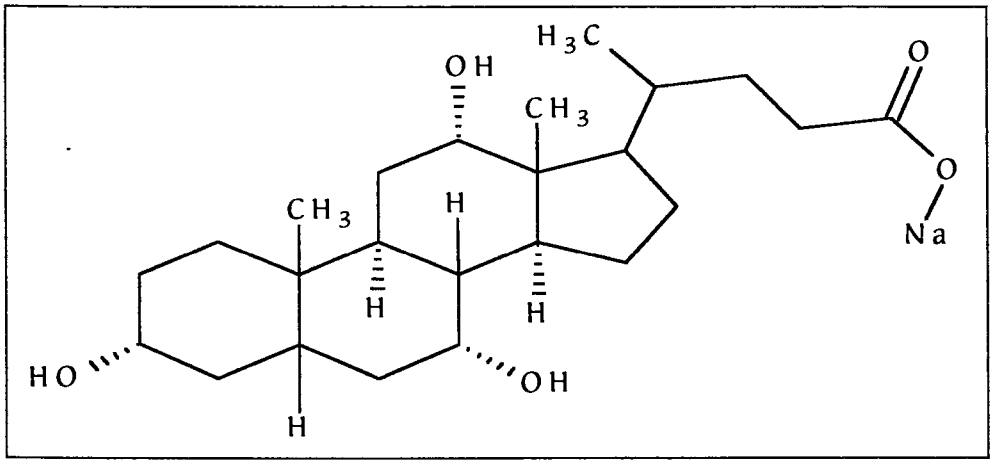

Figura IV.17 - Fórmula estrutural plana do colato de sódio.

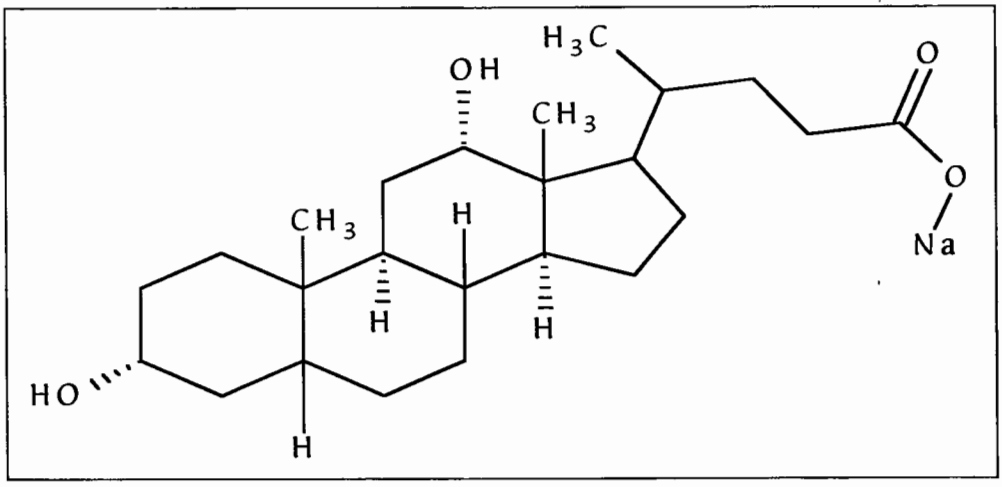

Figura IV.18 - Fórmula estrutural plana do deoxicolato de sódio.

IV.2.2.1.8. BILIRRUBINA:

A Figura IV.19, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão da bilirrubina. A Tabela IV.12, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto, Figura IV.20.

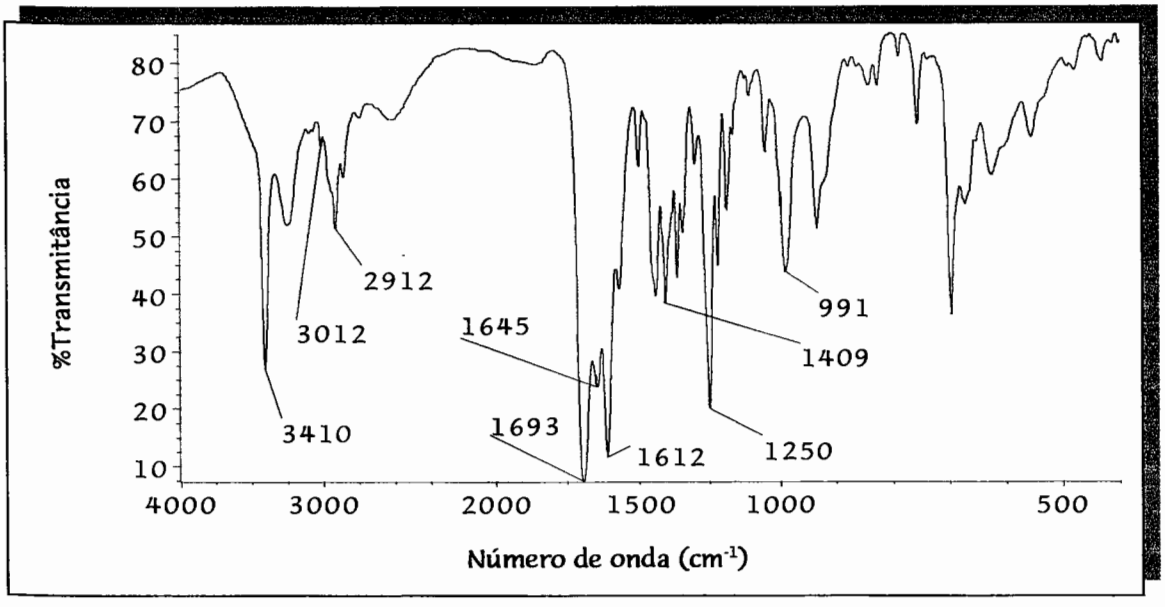

Figura IV.19 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão da bilirrubina.

Tabela IV.12 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão da bilirrubina e suas atribuições.

Compostos	N° de onda (cm^{-1})	Atribuições
Bilirrubina	3410	ν(N-H)
	3012	ν(C-H) de carbono sp^2
	~ 3600 à 2300	ν(OH) do ácido carboxílico dimerizado
	1693	ν(COOH)
	1645 e 1612	ν(C=O-N)
	1409	δ(C-H) no plano C=C vinílico
	1250	ν(C-O) da carbonila
	991	δ(C-H) fora do plano

onde: ν = estiramento; δ = deformação

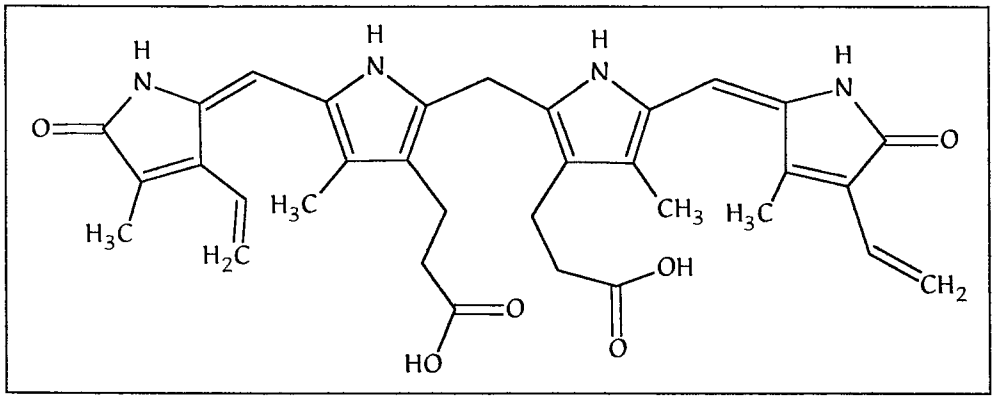

Figura IV.20 - Fórmula estrutural plana da bilirrubina.

IV.2.2.1.8. BILIRRUBINATO DE CÁLCIO:

A Figura IV.21, evidencia as principais bandas no espectro de absorção na região do infravermelho, características do padrão do bilirrubinato de cálcio sintetizado em nossos laboratórios conforme procedimento descrito por EDWARDS *et alii* (1958). A Tabela IV.13, apresenta as atribuições dessas bandas, que corroboram com a fórmula estrutural plana do referido composto,

Figura IV.22. Porém, a presença da banda em 3427cm^{-1} sugere que essa amostra está contaminada com NaOH usado no processo de síntese desse material. Os resultados de análise elementar, Tabela IV.4, indicaram percentuais de C, H e N abaixo daqueles esperados. As curvas TG/DTG apresentadas no item IV.3.1.9, confirmam a presença de H_2O de um outro componente nessa amostra, que é estável termicamente até 900°C e, ainda, que esta amostra sintetizada apresenta-se com aproximadamente 90% de pureza. A presença desses contaminantes, no entanto, não prejudicam a interpretação dos resultados.

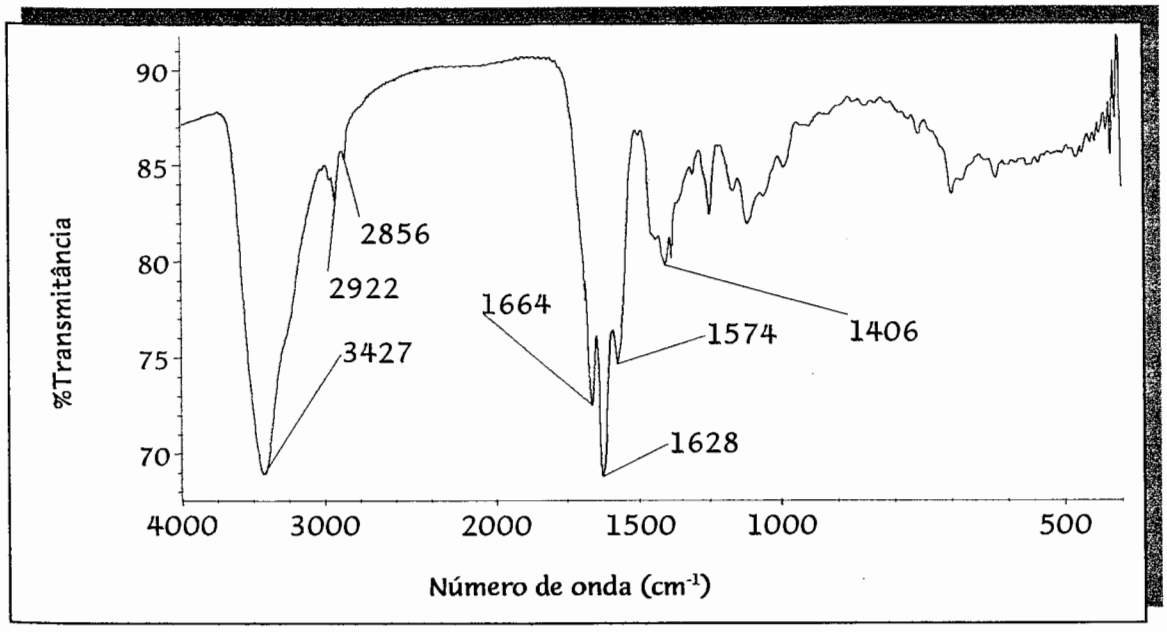

Figura IV.21 - Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão do bilirrubinato de cálcio.

Tabela IV.13 - Principais bandas de absorção na região do infravermelho do padrão do bilirrubinato de cálcio e suas atribuições.

Compostos	Nº de onda (cm^{-1})	Atribuições
Bilirrubinato de cálcio	3427	ν(OH)
	2922 e 2856	ν(C-H) de carbono sp^3 saturado/alifático
	1664 e 1628	ν(C=O-N)
	1574	$\nu(COO^-Me^+)$
	1406	$\nu(COO^-Me^+)$

onde: ν = estiramento; δ = deformação

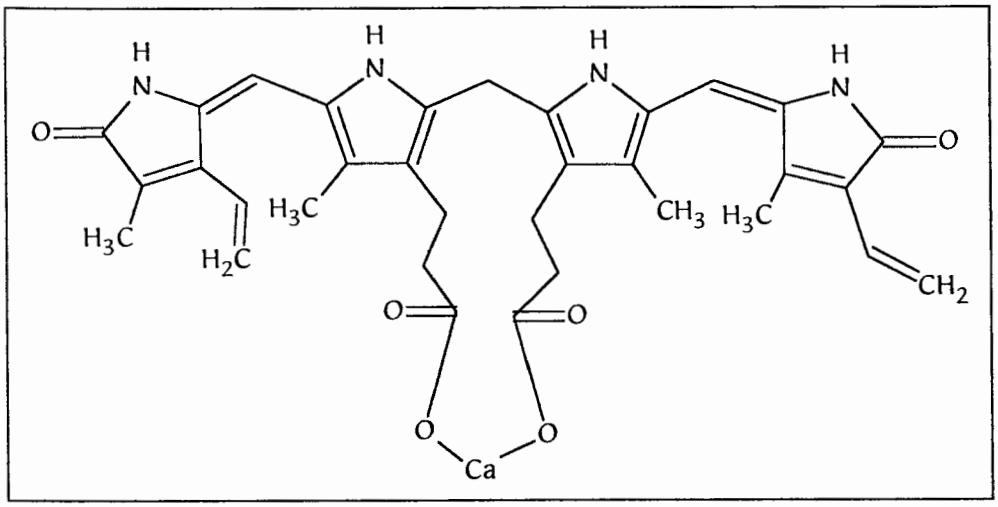

Figura IV.22 - Fórmula estrutural plana do bilirrubinato de cálcio.

IV.2.2.2. AMOSTRAS DE CÁLCULOS BILIARES E BILE QUE FAZEM PARTE DA NOVA CLASSIFICAÇÃO BILIAR

Neste item, destacar-se-á as interpretações dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculos biliares e bile, realizadas com base em dados da literatura (NAKANISHI, 1964; NYQUIST & KAGEL, 1971; POUCHERT, 1975). Convém mencionar que, para estas interpretações foi escolhida apenas uma amostra de cálculo biliar e a correspondente bile, do mesmo paciente, referente aos grupos de A a H.

IV.2.2.2.1. GRUPO A:

A Figura IV.23, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho das principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1549 e 1402 cm^{-1}); bilirrubina (1656 cm^{-1}); ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) e ésteres biliares (1740 cm^{-1}) na amostra de bile BF16. No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença do colesterol (1465, 1375, 1365 e 1057 cm^{-1}) e bilirrubinato de cálcio (1570 cm^{-1}) na amostra SF16. Deve-se ressaltar, no entanto, que à amostra SF16 é um tipo de cálculo biliar constituido basicamente por colesterol, e que a presença do bilirrubinato de cálcio nela é atribuida à banda de estiramento em 1570 cm^{-1}, a qual não é observada nos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras com teor de nitrogênio (%N) abaixo de 0,3% (considerado como limite de erro da instrumentação), determinado por análise elementar (Figura IV.24 e Tabela IV.2). As amostras, cujo teor de nitrogênio (%N) está acima desse limite (0,3%), pertencem a esse grupo devido à similaridade tanto dos perfis das curvas termoanalíticas, Figuras IV.40 e IV.41, quanto dos teores de carbono (%C) e hidrogênio (%H), Tabela IV.2.

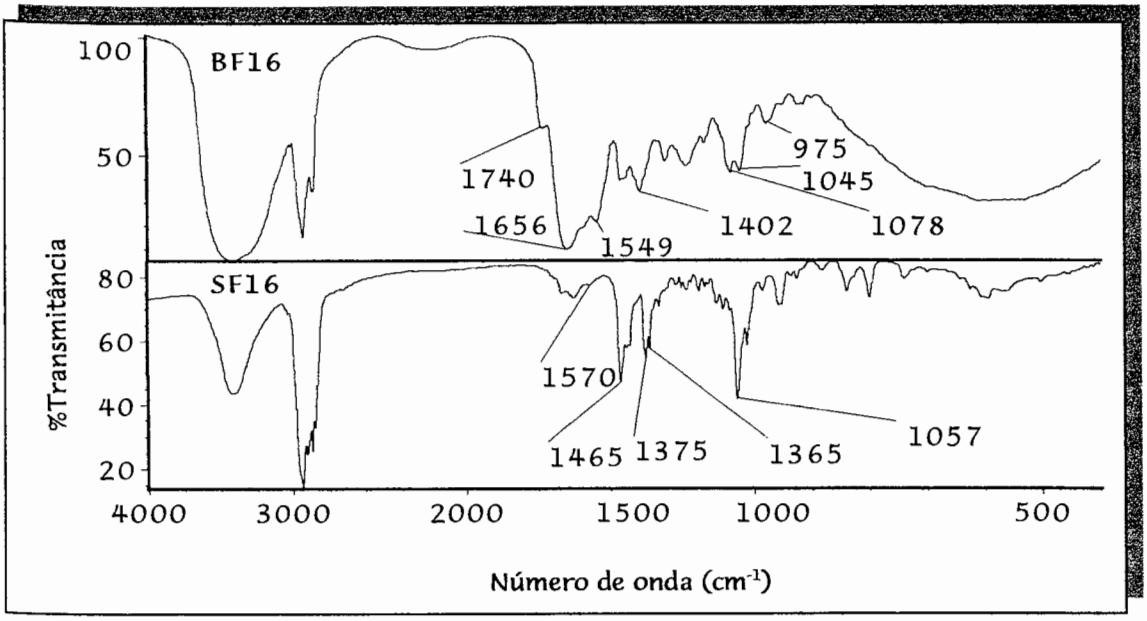

Figura IV.23 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF16 e bile BF16, pertencente ao grupo A.

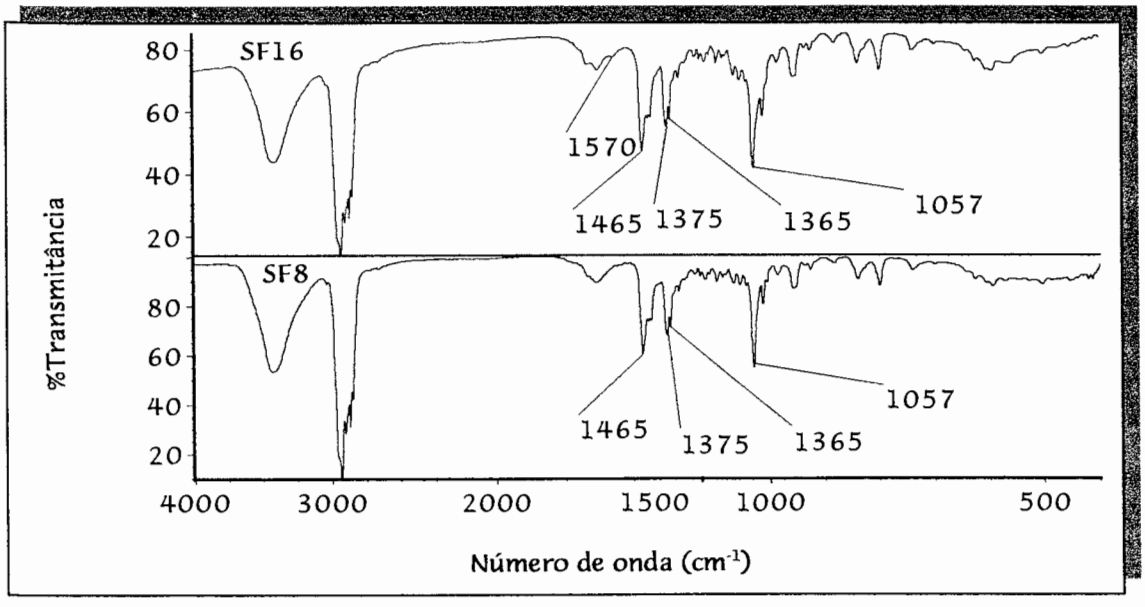

Figura IV.24 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculos biliares SF16 e SF8, pertencentes ao grupo A, que apresentaram teores de nitrogênio distintos via análise elementar, ou seja, 0,42 e 0,18%, respectivamente.

IV.2.2.2.2. GRUPO B:

A Figura IV.25, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho com as principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1548 e 1400 cm^{-1}); bilirrubina (1636 cm^{-1}); ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) e ésteres biliares (1740 cm^{-1}) na amostra de bile BF17. No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença do colesterol (1465, 1375, 1365 e 1057 cm^{-1}); bilirrubinato de cálcio (1570 cm^{-1}) e carbonato de cálcio (1440 e 876 cm^{-1}), na amostra SF17.

Deve-se ressaltar, porém, que três amostras desse grupo apresentam teores de nitrogênio em torno de 0,3%, uma indicação da ausência de bilirrubinato nas mesmas. No entanto, o perfil das curvas termoanalíticas e os teores de carbono (%C) e hidrogênio (%H) são similares para com as amostras com teor de nitrogênio acima de 0,3%, sugerindo, assim, sua inclusão nesse grupo (Figuras IV.40 e 41) e Tabela IV.2. A principal diferença nas amostras desse grupo, é constituida pela presença do $CaCO_3$.

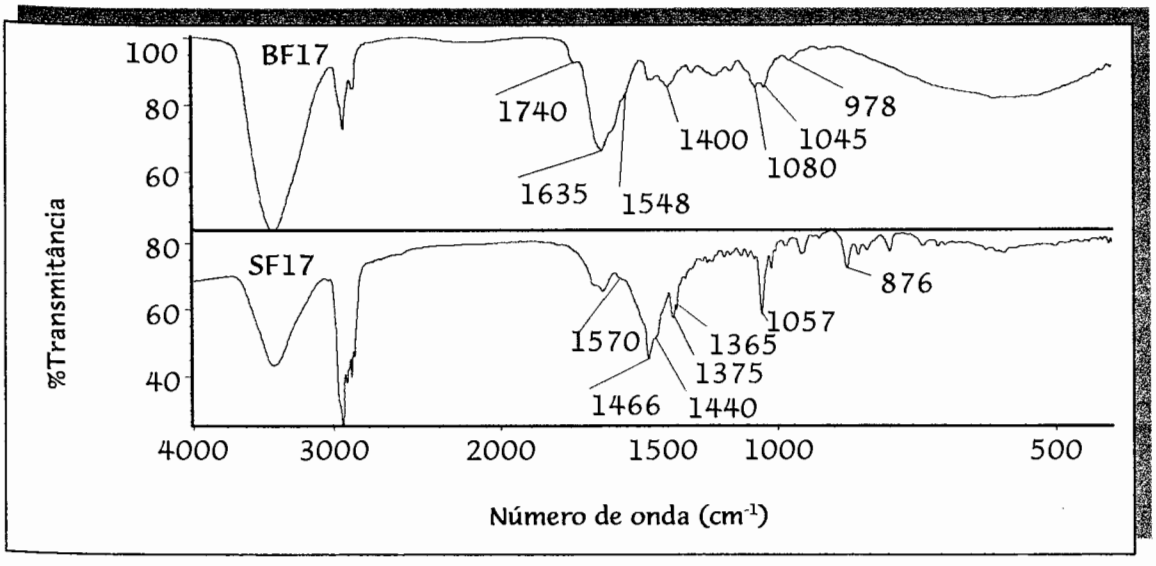

Figura IV.25 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF17 e bile BF17, pertencente ao grupo B.

IV.2.2.2.3. GRUPO C:

A Figura IV.26, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho com as principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1548 e 1400 cm^{-1}); bilirrubina (1636 cm^{-1}); ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) e ésteres biliares (1740 cm^{-1}) na amostra de bile BM58. No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença do colesterol (1465, 1375, 1365 e 1057 cm^{-1}) e bilirrubinato de cálcio (1570 cm^{-1}), na amostra SM58.

As amostras desse grupo diferenciam-se dos grupos A e B, não só pela distinção dos teores de nitrogênio (%N), carbono (%C) e hidrogênio (%H), Tabela IV.2, mas também, pelo perfil das curvas termoanalíticas, como mostram as Figuras IV.40 e 41.

Deve-se ressaltar que, tanto os espectros de absorção na região do infravermelho quanto os perfis das curvas termoanalíticas das amostras de cálculos biliares desse grupo, não apresentam indícios que caracterizem a presença do carbonato de cálcio na sua composição, diferenciando-o ainda mais do grupo B.

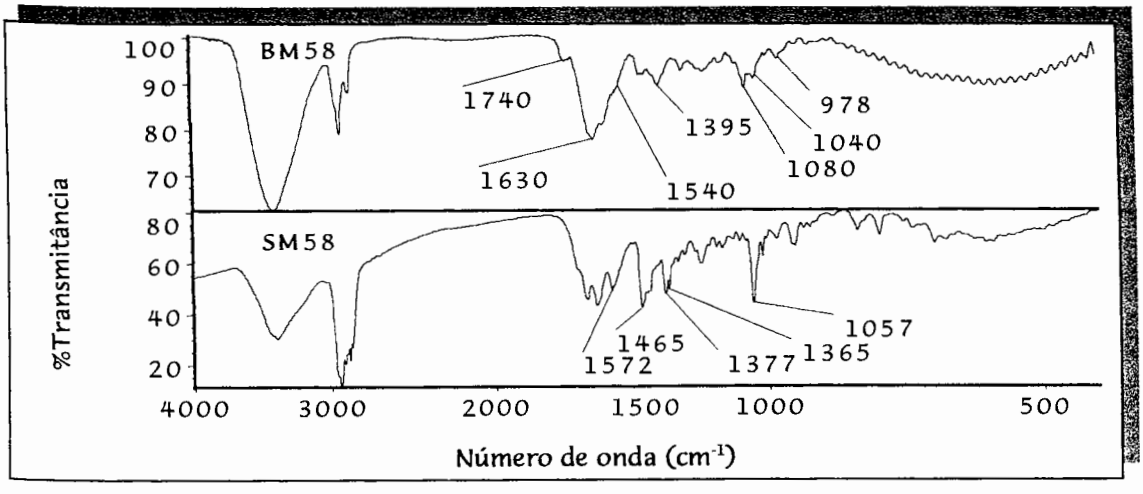

Figura IV.26 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SM58 e bile BM58, pertencente ao grupo C.

IV.2.2.2.4. GRUPO D:

A Figura IV.27, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho com as principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1396 cm^{-1}); bilirrubina (1635, 1601, 1225 cm^{-1}); ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) e ésteres biliares (1740 cm^{-1}) na amostra de bile (BM31). No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença de sais biliares (1400, 1080, 1050 cm^{-1}); bilirrubinato de cálcio (1660, 1625, 1570 cm^{-1}) e bilirrubina (1250 cm^{-1}), na amostra SM31.

Nesse grupo a ausência de colesterol e a presença do bilirrubinato de cálcio e da bilirrubina nas amostras dos cálculos biliares estão coerentes com a diminuição dos teores de carbono (%C) e hidrogênio (%H) e com o aumento dos teores de nitrogênio (%N), obtidos pela análise elementar, Tabela IV.2. Ressalta-se, também, sua confirmação mediante os perfis das curvas termoanalíticas, Figuras IV.40 e 41.

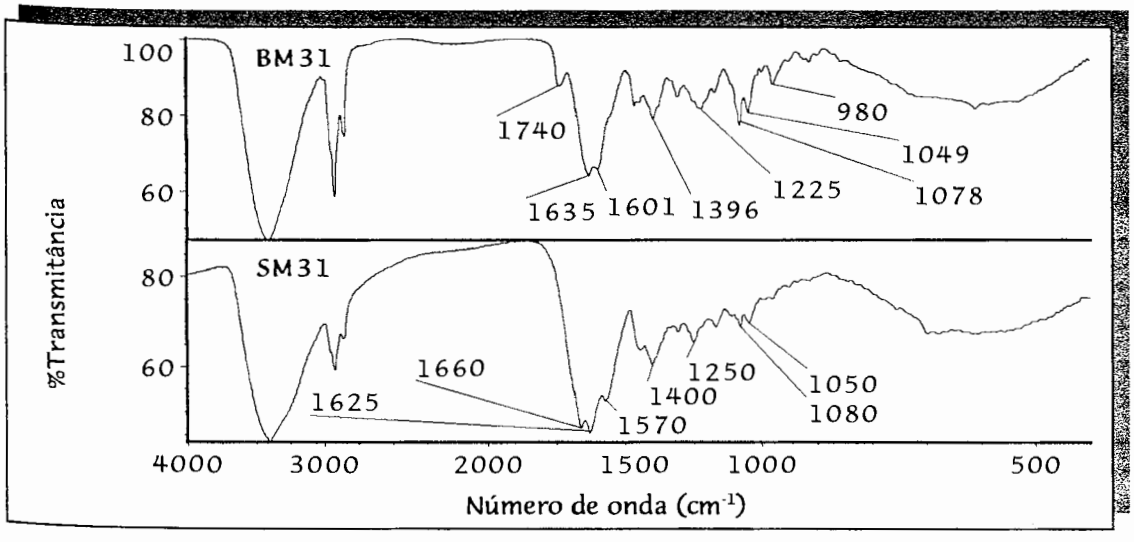

Figura IV.27 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SM31 e bile BM31, pertencente ao grupo D.

IV.2.2.2.5. GRUPO E:

A Figura IV.28, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho com as principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1405 cm^{-1}); bilirrubina (1635, 1560 cm^{-1}); ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) e ésteres biliares (1740 cm^{-1}) na amostra de bile BF54. No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença de sais biliares (1405, 1085, 1055 cm^{-1}); bilirrubinato de cálcio (1660, 1630, 1565 cm^{-1}) e bilirrubina (1245, 990 cm^{-1}), na amostra SF54.

A explicação relativa à ausência de colesterol e à presença do bilirrubinato de cálcio e da bilirrubina para esse grupo, é similar à realizada para o grupo D. Entretanto, o que distingue as amostras de cálculos biliares dos grupos D e E, são os perfis das curvas termoanalíticas, Figuras IV.40 e 41.

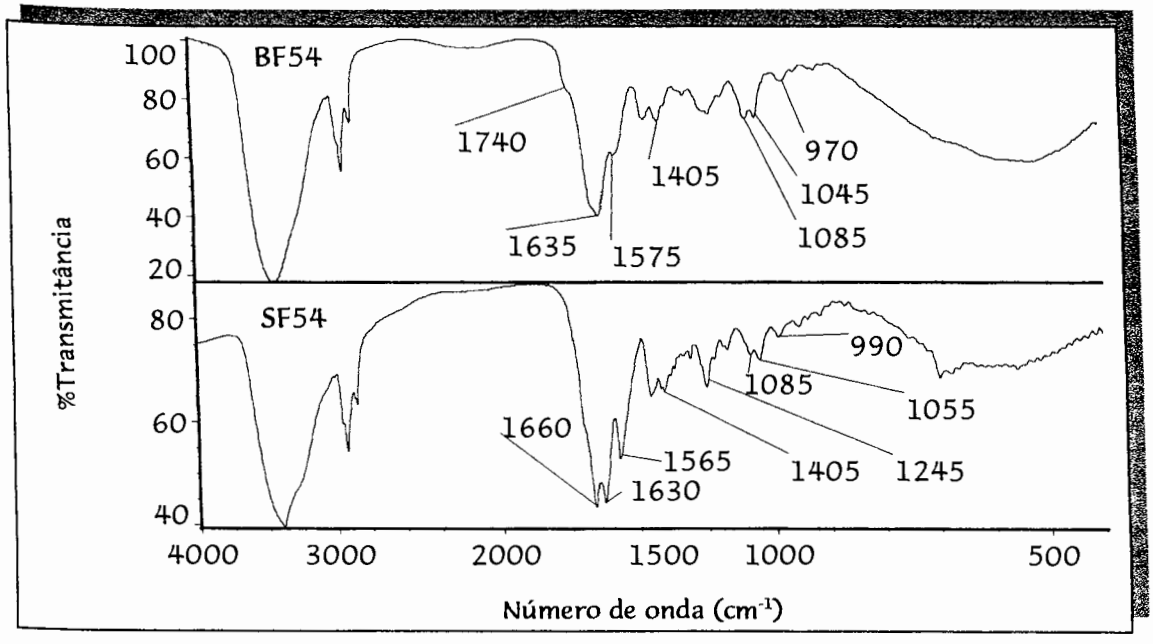

Figura IV.28 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF54 e bile BF54, pertencente ao grupo E.

IV.2.2.2.6. GRUPO F:

A Figura IV.29, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho com as principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1555, 1405 cm^{-1}); bilirrubina (1655 cm^{-1}) ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) na amostra de bile BF47. No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença de bilirrubinato de cálcio (1660, 1628, 1574 cm^{-1}) e bilirrubina (1250, 991 cm^{-1}), na amostra SF47.

Explica-se a ausência de colesterol e presença do bilirrubinato de cálcio e da bilirrubina nesse grupo, pela similaridade com os grupos D e E. Mas, o que mantém à distinção entre as amostras de cálculos biliares dos grupos D, E e F são os perfis das curvas termoanalíticas, Figuras IV.40 e 41.

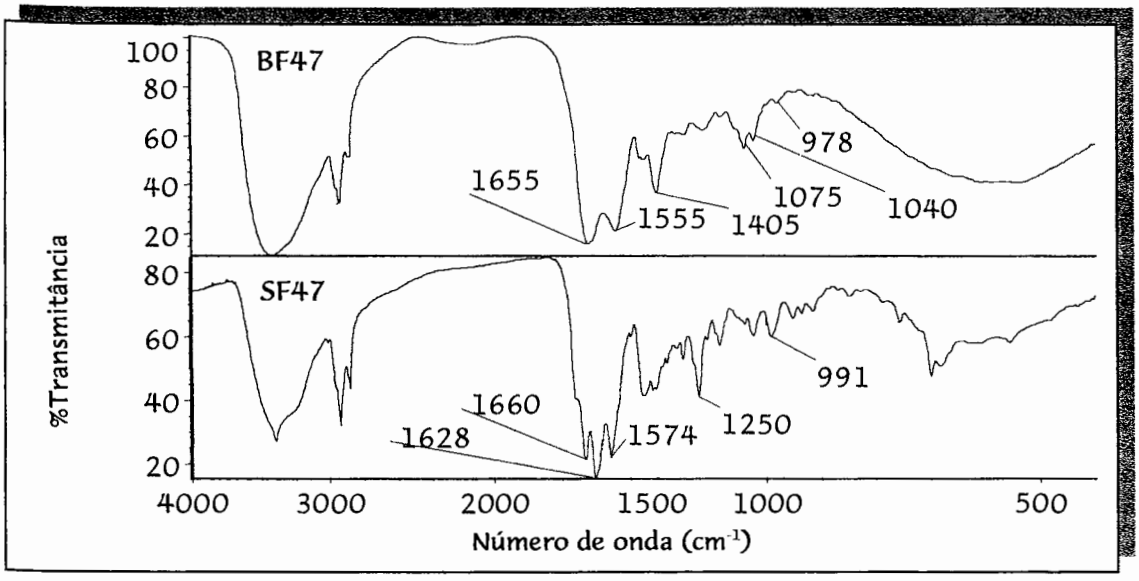

Figura IV.29 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF47 e bile BF47, pertencente ao grupo F.

IV.2.2.2.7. GRUPO G :

A Figura IV.30, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho com as principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1555, 1405 cm^{-1}), bilirrubina (1655 cm^{-1}) e ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) e éster biliar (1733 cm^{-1}) na amostra de bile BM44. No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença de bilirrubinato de cálcio (1655, 1621, 1569 cm^{-1}), carbonato de cálcio (1440, 862 cm^{-1}) e ortofosfato de cálcio (569, 603, 707, 1034, 1293, 1233 cm^{-1}) na amostra SM44. Relevante é a presença, em sua composição, do ortofosfato de cálcio. Único caso neste estudo de cálculos biliares.

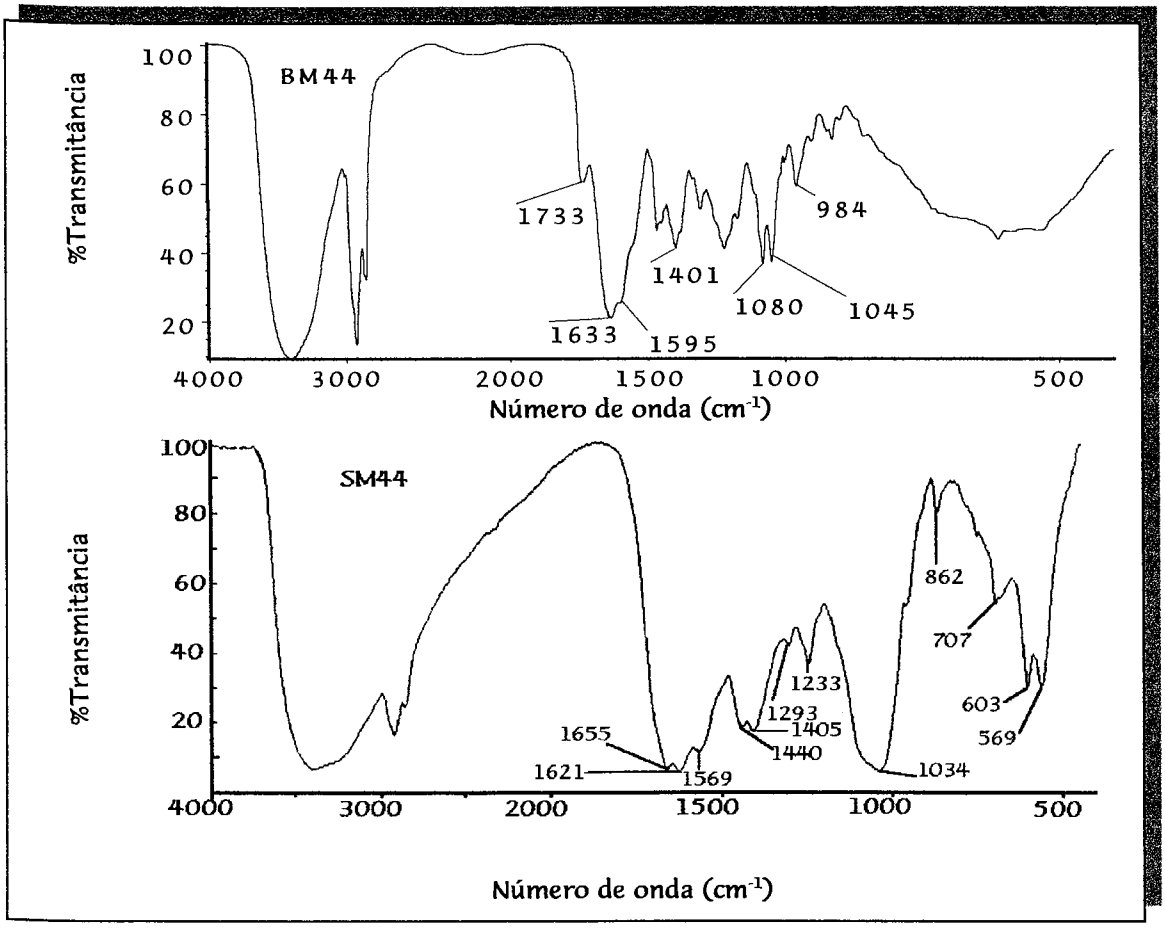

Figura IV.30 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SM44 e bile BM44, pertencente ao grupo G.

IV.2.2.2.8. GRUPO H :

A Figura IV.31, evidencia os espectros de absorção na região do infravermelho com as principais bandas que caracterizam a presença de sais biliares (1396 cm^{-1}), bilirrubina (1633, 1597, 1223 cm^{-1}), ácidos cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico (1080, 1045 e 978 cm^{-1}, que caracterizam a presença das hidroxílas em suas estruturas) e ésteres biliares (1732 cm^{-1}) na amostra de bile (BF15). No caso dos cálculos biliares comprovou-se a presença de bilirrubinato de cálcio (1627 cm^{-1}) e carbonato de cálcio (2508, 1795, 1430, 876, 711 cm^{-1}), na amostra SF15.

Essa amostra de cálculo biliar foi considerada um caso atípico, pelo alto teor de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) determinado nos ensaios de termogravimetria (cerca de 81,45 %). A presença desse composto foi comprovada tanto pelo espectro de absorção na região do infravermelho (Figuras IV.31), difratograma de raios X (Figuras IV.39), curvas TG/DTG quanto pelo baixo teor de carbono (Tabela IV.2) encontrado via análise elementar, comparado com a maioria das amostras dos outros grupos.

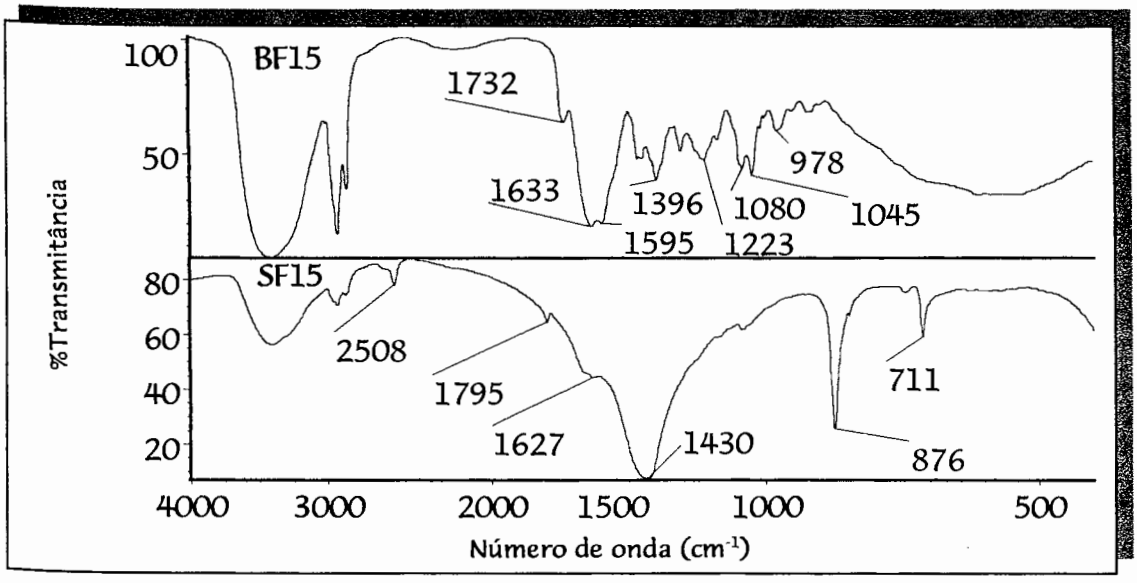

Figura IV.31 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculo biliar SF15 e bile BF15, pertencente ao grupo H.

As Figuras IV.32 e IV.33, evidenciam pelos espectros de absorção na região do infravermelho a distinção das amostras de cálculos biliares, reafirmando deste modo a formação da nova classificação biliar. No entanto, observou-se uma similitude na composição química das amostras de bile dos grupos de cálculos biliares A, B, C, D, E, H e G, excetuando-se apenas as do grupo F, o qual não apresentou bandas características do éster metílico de ácido cólico (Figuras IV.34 e IV.35). Logo, podemos dizer que ao se compararem aqueles grupos com os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos pela análise elementar, os dados se correlacionam com a concentração de sais biliares (colato de sódio, deoxicolato de sódio), de ácidos biliares (cólico, deoxicólico, quenodeoxicólico ou litocólico) da bilirrubina e, para alguns casos, com a do éster metílico de ácido cólico, presentes no material.

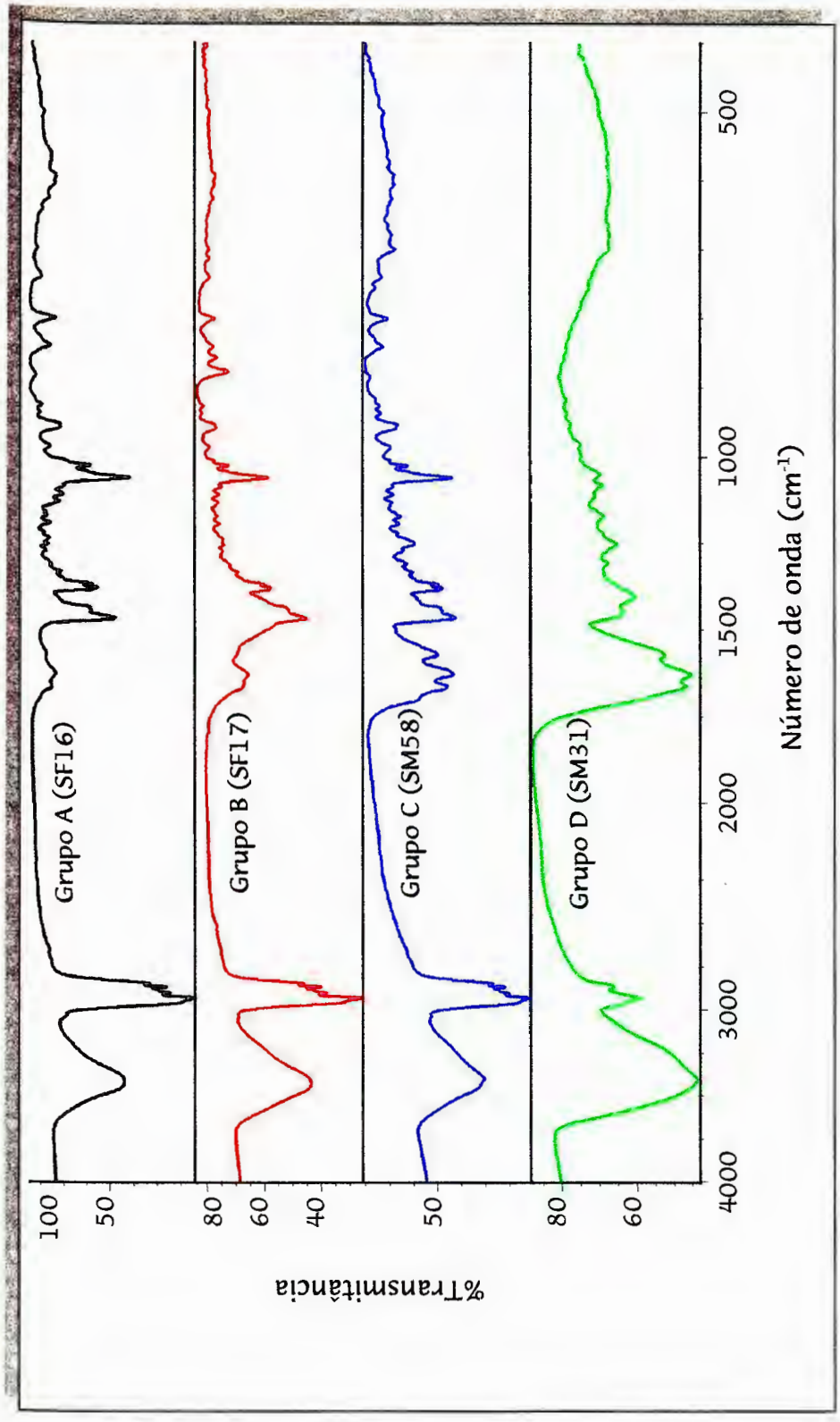

Figura IV.32 - Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras dos cálculos biliares, pertencentes aos grupos A, B, C, e D.

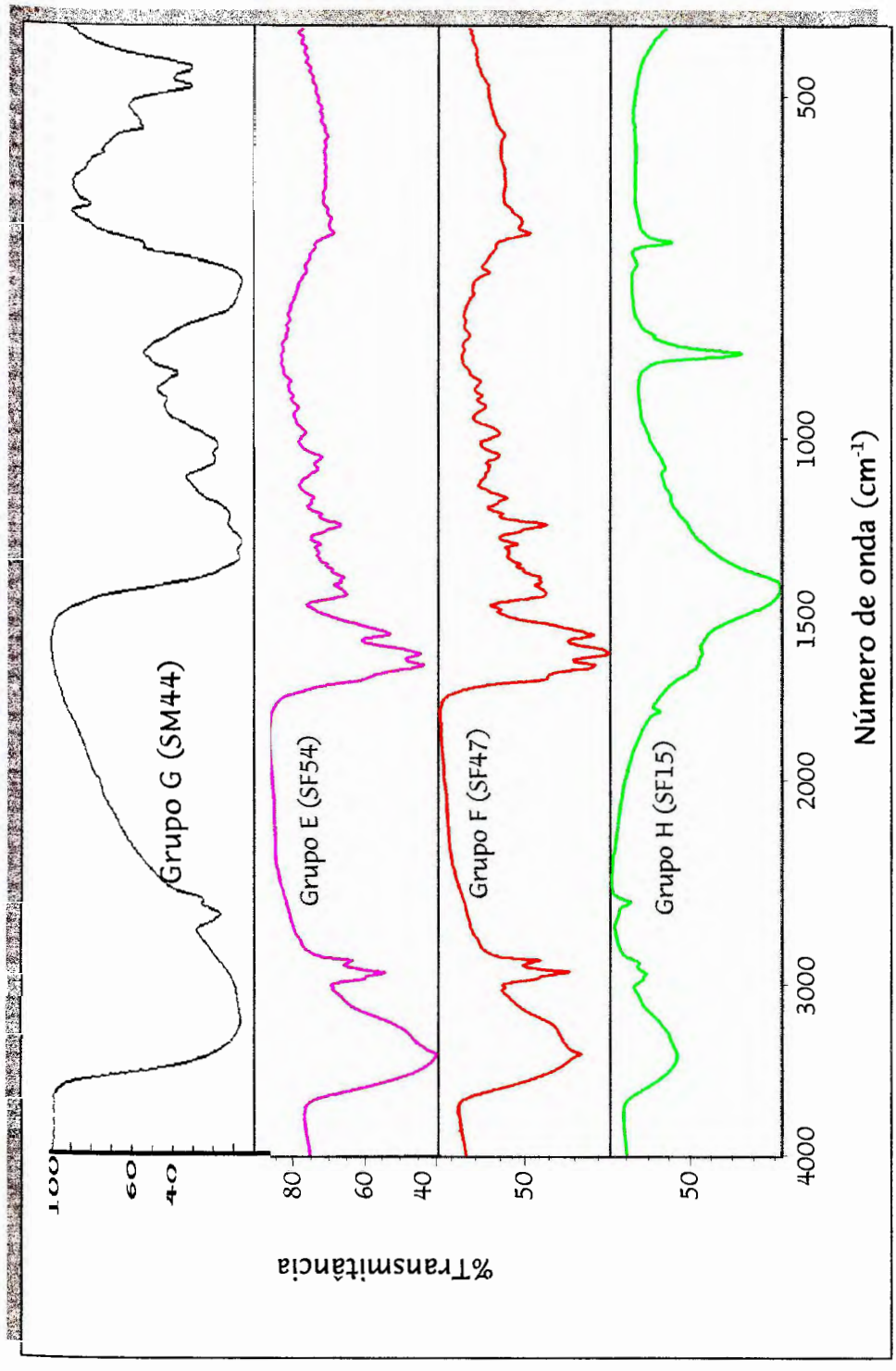

Figura IV.33 - Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de cálculos biliares, pertencentes aos grupos E, F, G e H.

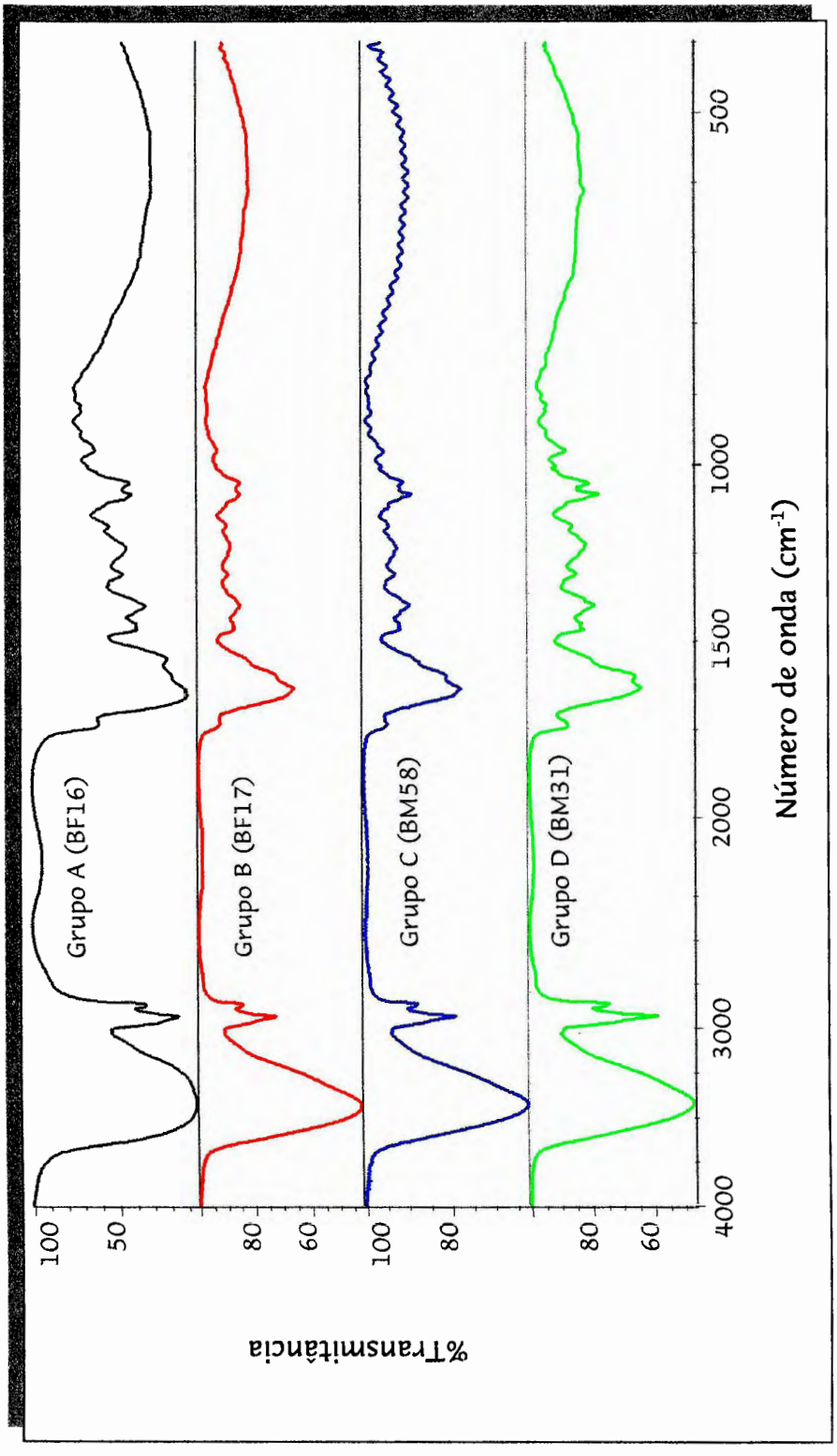

Figura IV.34 - Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de bile, pertencentes aos grupos A, B, C, e D.

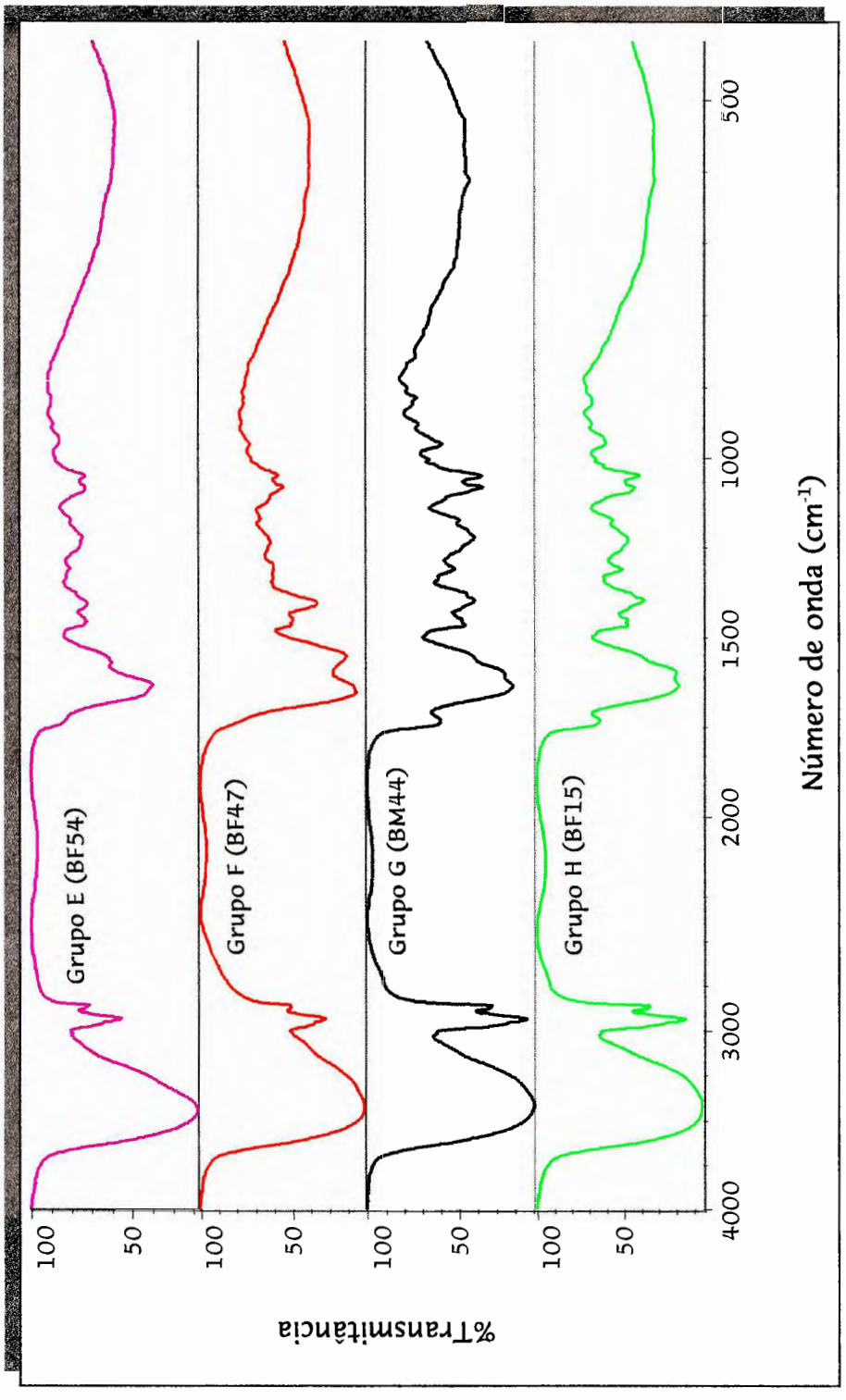

Figura IV.35 - Sobreposição dos espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de bile, pertencentes aos grupos E, F, G e H.

IV.2.3. Difração de Raios X (DRX)

Para esses ensaios foram escolhidas as mesmas amostras, submetidas aos experimentos para obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho, correspondentes aos grupos de A a H. No caso das amostras de bile, embora, visualmente com aspecto físico cristalino, os difratogramas de raios X foram indicativos de materiais amorfos, impossibilitando a sua interpretação.

Os difratogramas de raios X das amostras pertencentes a cada grupo, ao serem comparados, porém, com os padrões presentes no banco de dados *(JCPDF, 1995)*, indicaram as distâncias interplanares (representadas por setas nos difratogramas) e as intensidades relativas das linhas de difração, o que possibilitou a identificação de certas espécies químicas na composição das amostras.

As Figuras IV.36, IV.37, IV.38 e IV.43, mostram os difratogramas de raios X com as identificações dos componentes para as amostras dos cálculos biliares SF16, SF17, SM58 e SF15, pertencentes aos grupos A, B, C e H, respectivamente. No entanto, devido ao aspecto físico dos cálculos biliares das amostras SM56, SF54, SF47 e SM44, representantes dos grupos D, E, F e G, os difratogramas de raios X indicaram caráter amorfo, impossibilitando, com isso, sua interpretação (Figuras IV.39, IV.40, IV.41 e IV.42).

Com relação as amostras dos cálculos biliares dos grupos A, B C e H, além de completar a caracterização (Figuras IV.36, IV.37, IV.38 e IV.43), os resultados da difração de raios X confirmaram os dados obtidos nos espectros de absorção na região do infravermelho, evidenciando a presença dos seguintes compostos: bilirrubina e colesterol nas amostras SF16, SF17 e SM58, dolomita [$CaMg(CO_3)_2$] na SF17, calcita ($CaCO_3$) na SM58 e o fosfato de cálcio ($Ca_2P_6O_{17}$) na SF15. Ressalte-se que, na SF15, foram identificadas duas formas estruturais de carbonato de cálcio ($CaCO_3$): calcita e vaterita.

A Figura IV.44, mostra claramente mediante a sobreposição dos difratogramas de raios X, a distinção das amostras de cálculos biliares pertencentes aos grupos A à H.

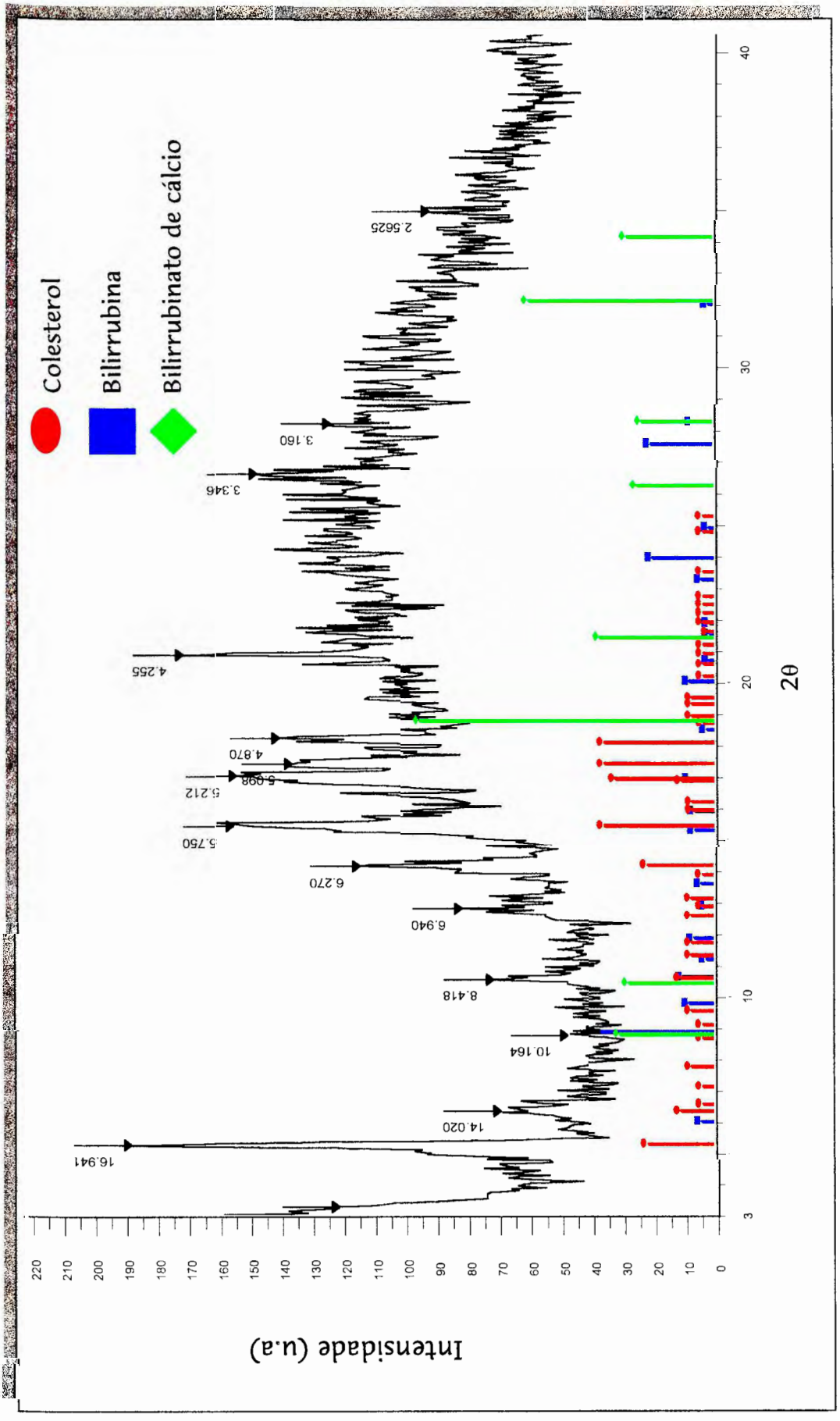

Figura IV.36 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF16, pertencente ao grupo A, obtido utilizando o método do pó.

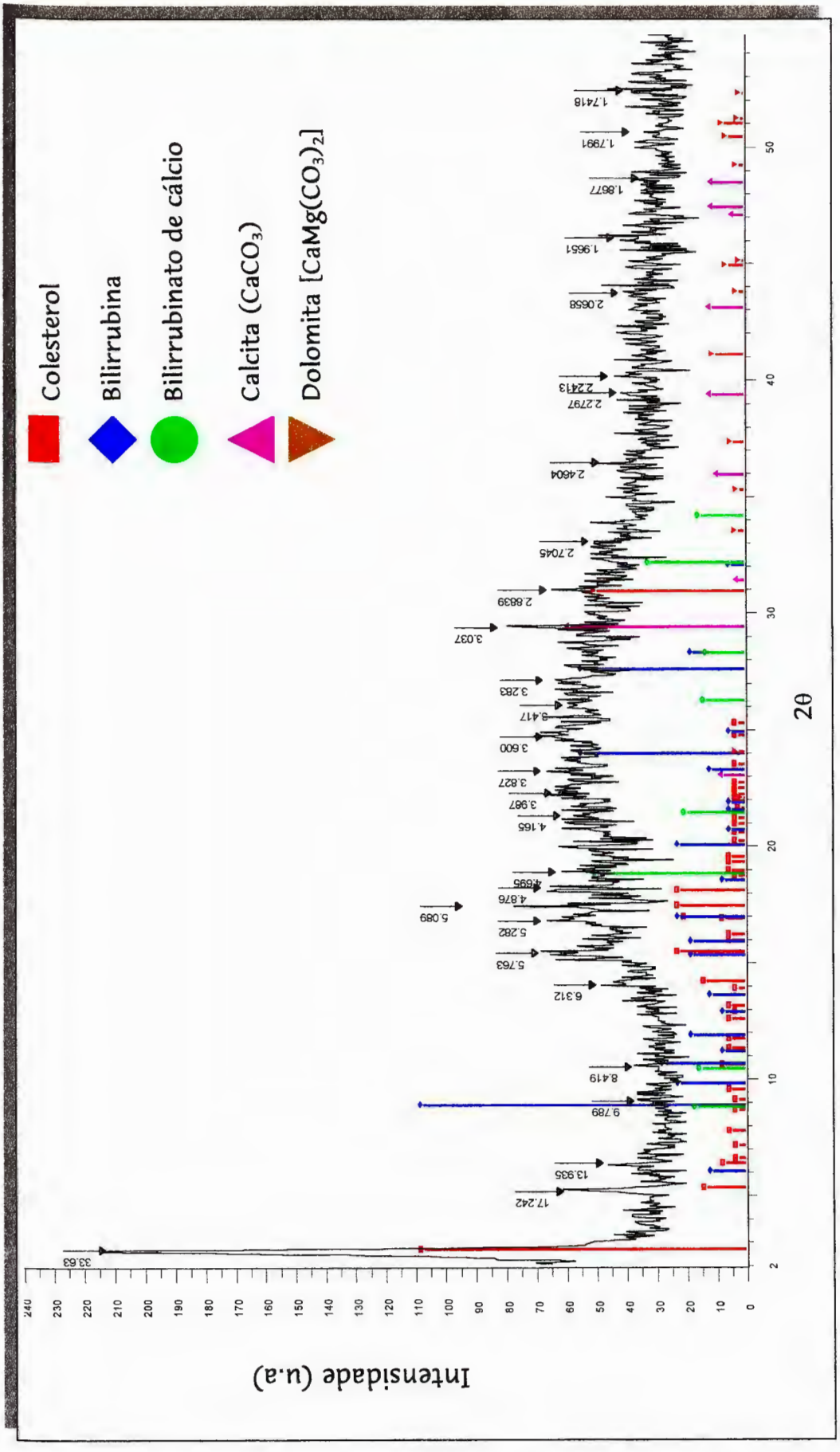

Figura IV.37 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF17, pertencente ao grupo B, obtido utilizando o método do pó.

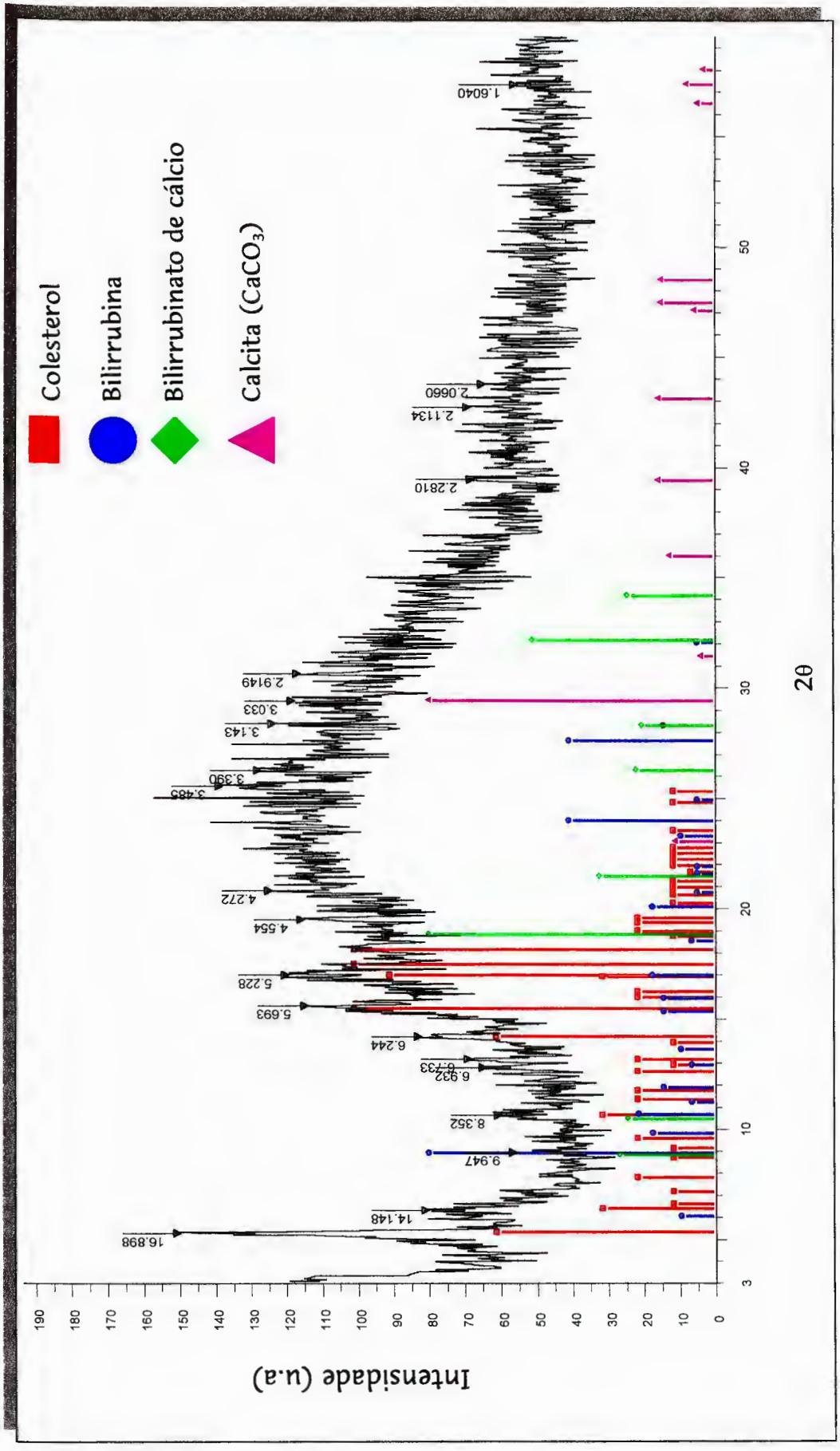

Figura IV.38 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SM58, pertencente ao grupo C, obtido utilizando o método do pó.

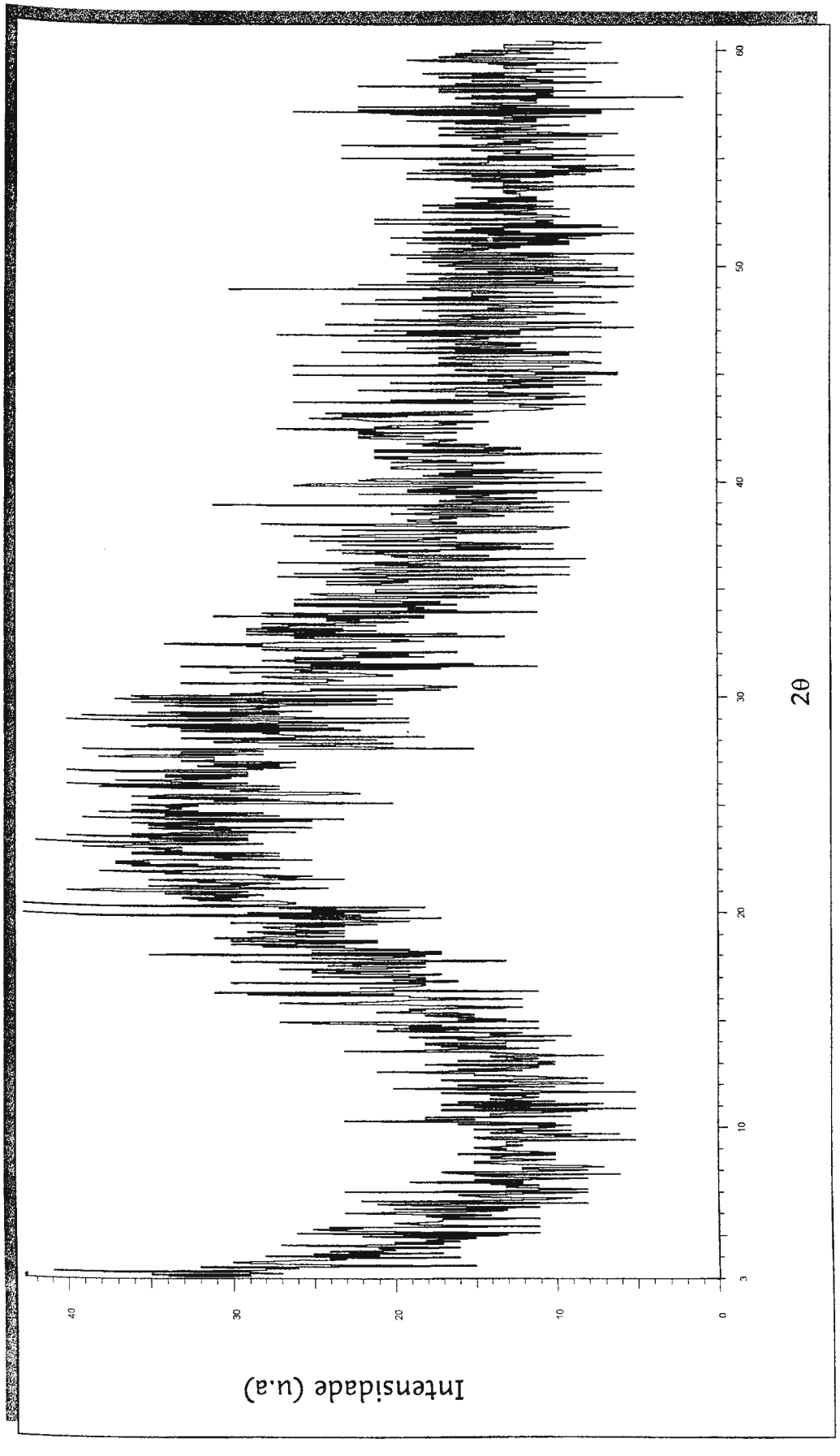

Figura IV.39 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SM31, pertencente ao grupo D, obtido utilizando o método do pó.

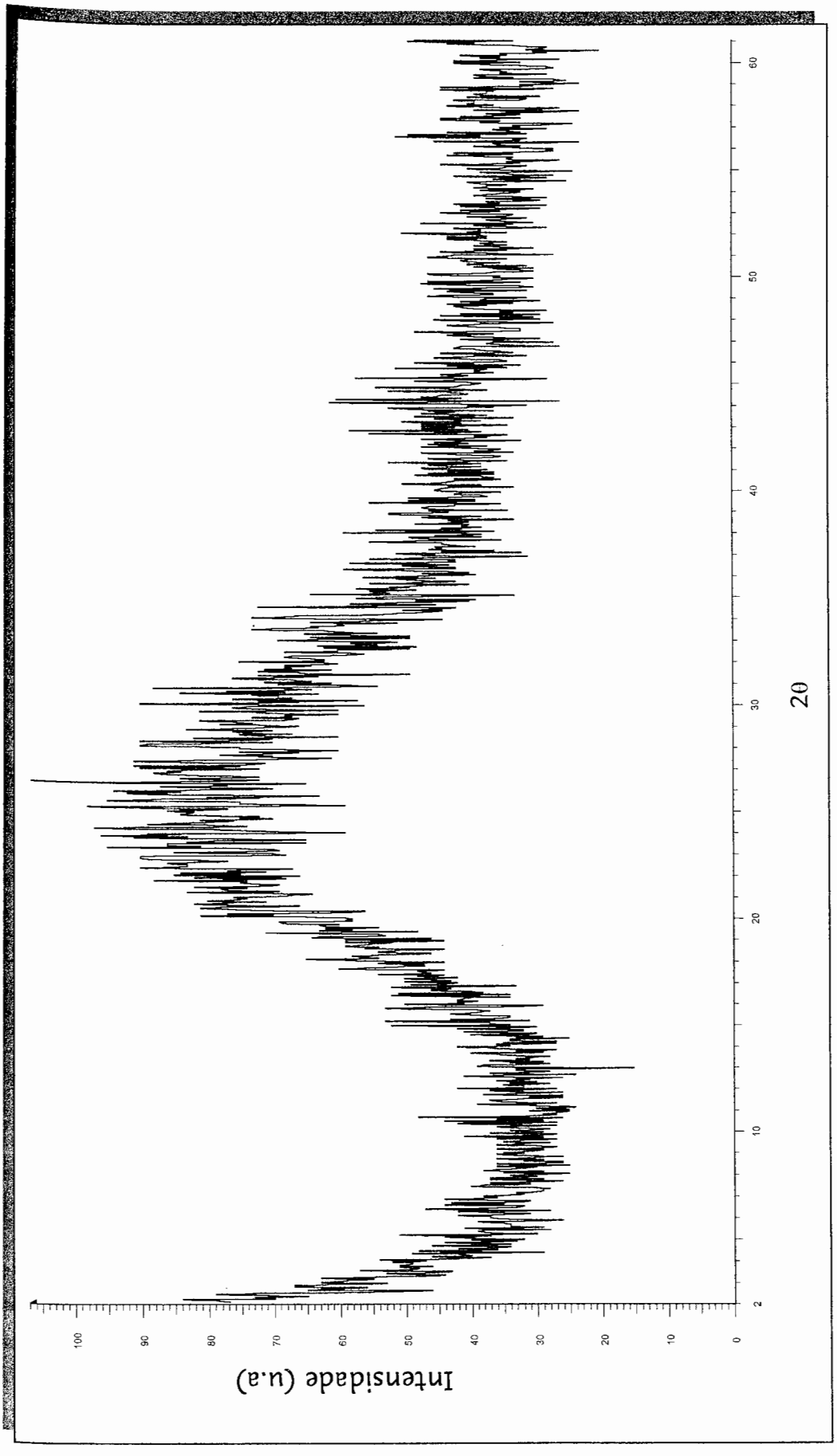

Figura IV.40 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF54, pertencente ao grupo E , obtido utilizando o método do pó.

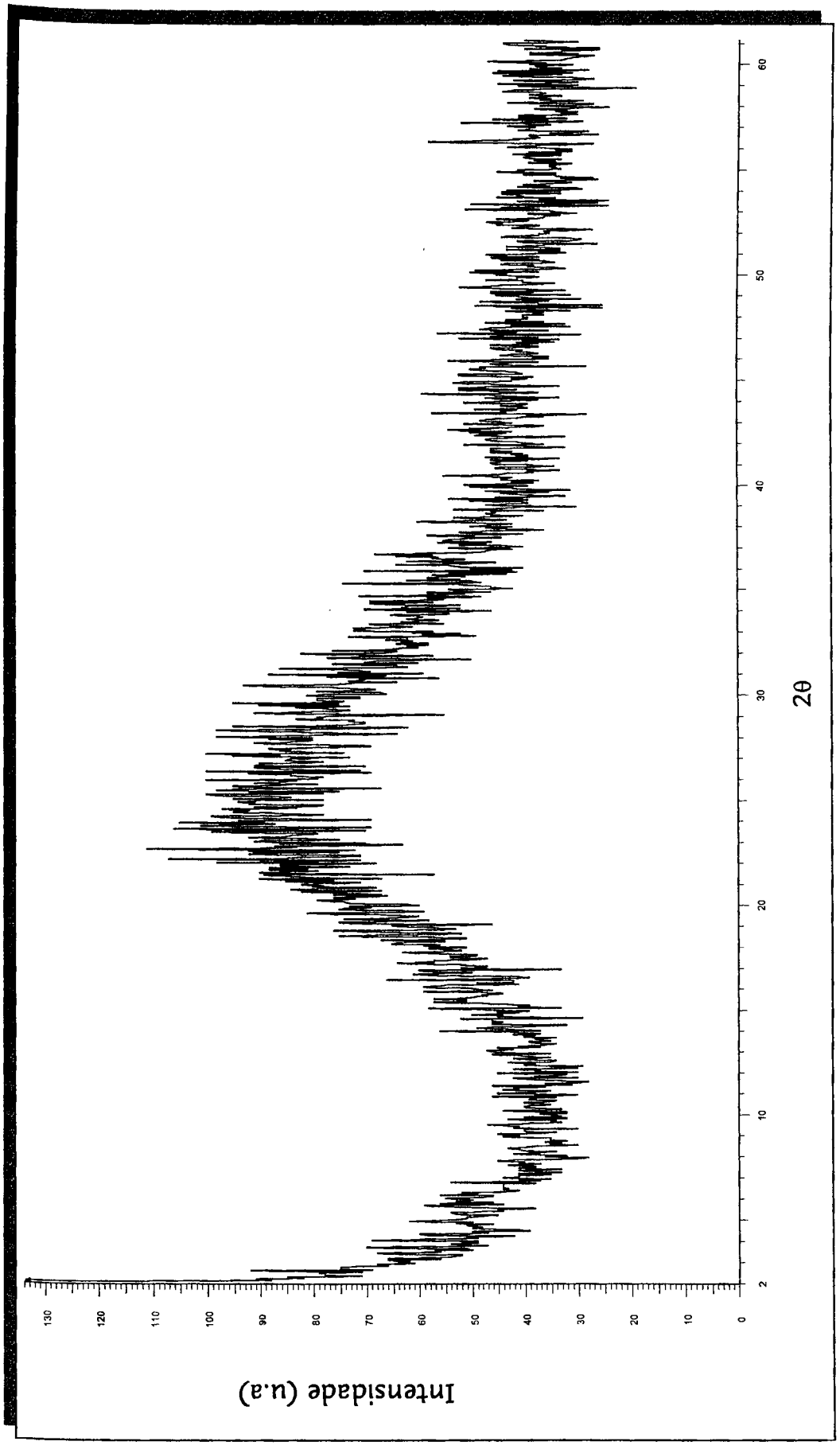

Figura IV.41 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF47, pertencente ao grupo F, obtido utilizando o método do pó.

BIBLIOTECA

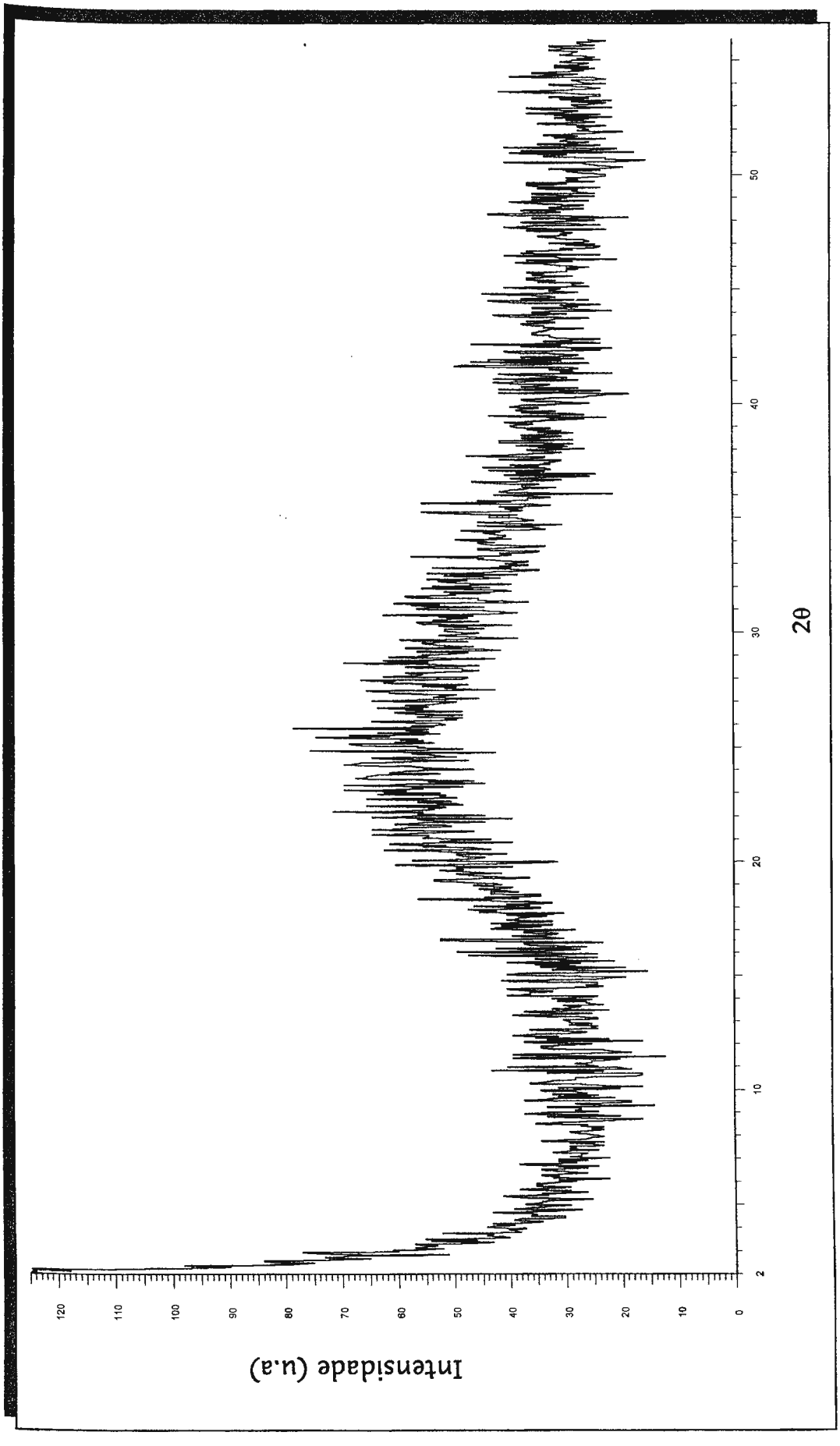

Figura IV.42 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SM44, pertencente ao grupo G, obtido utilizando o método do pó.

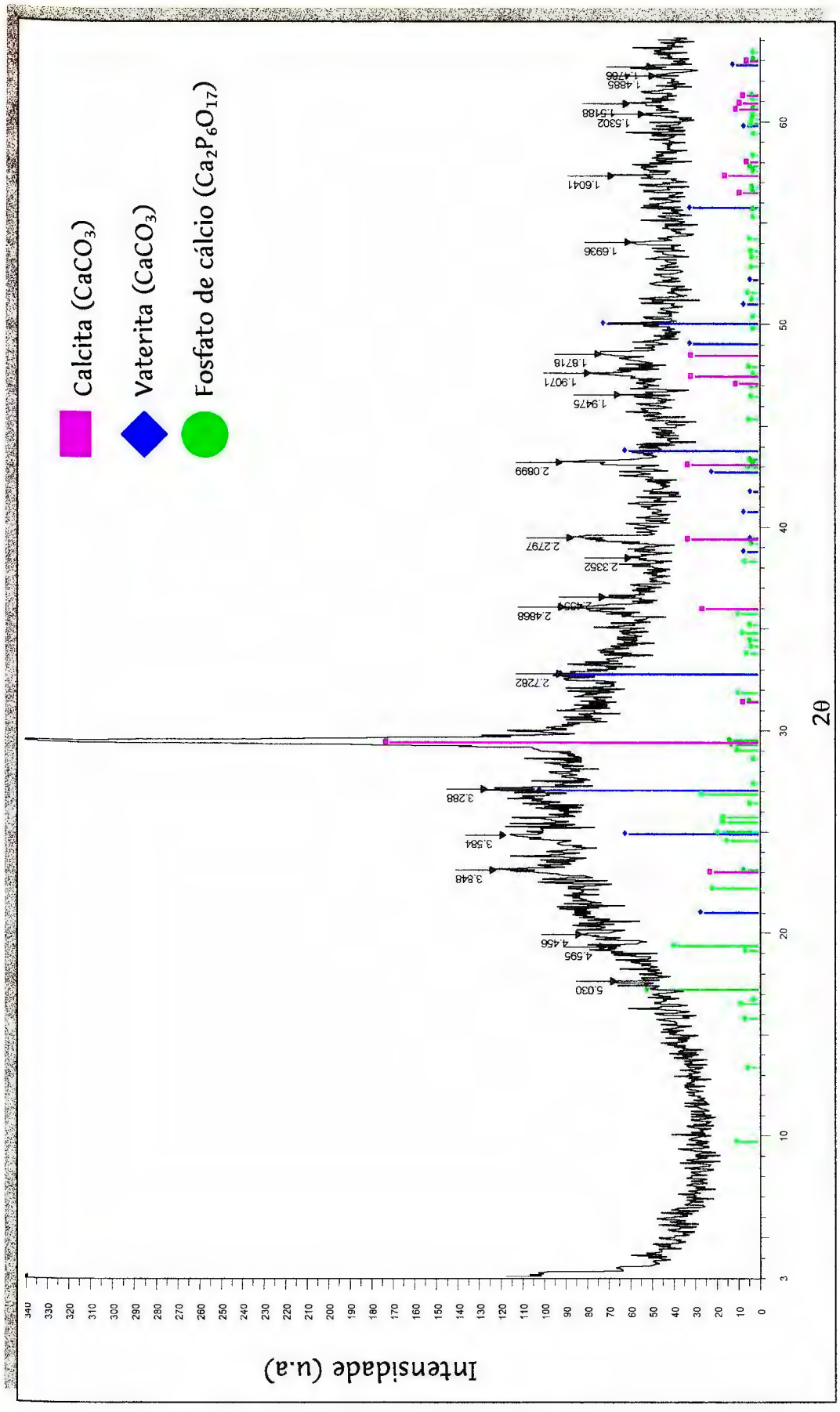

Figura IV.43 - Difratograma de raios X da amostra do cálculo biliar SF15, pertencente ao grupo H, obtido utilizando o método do pó.

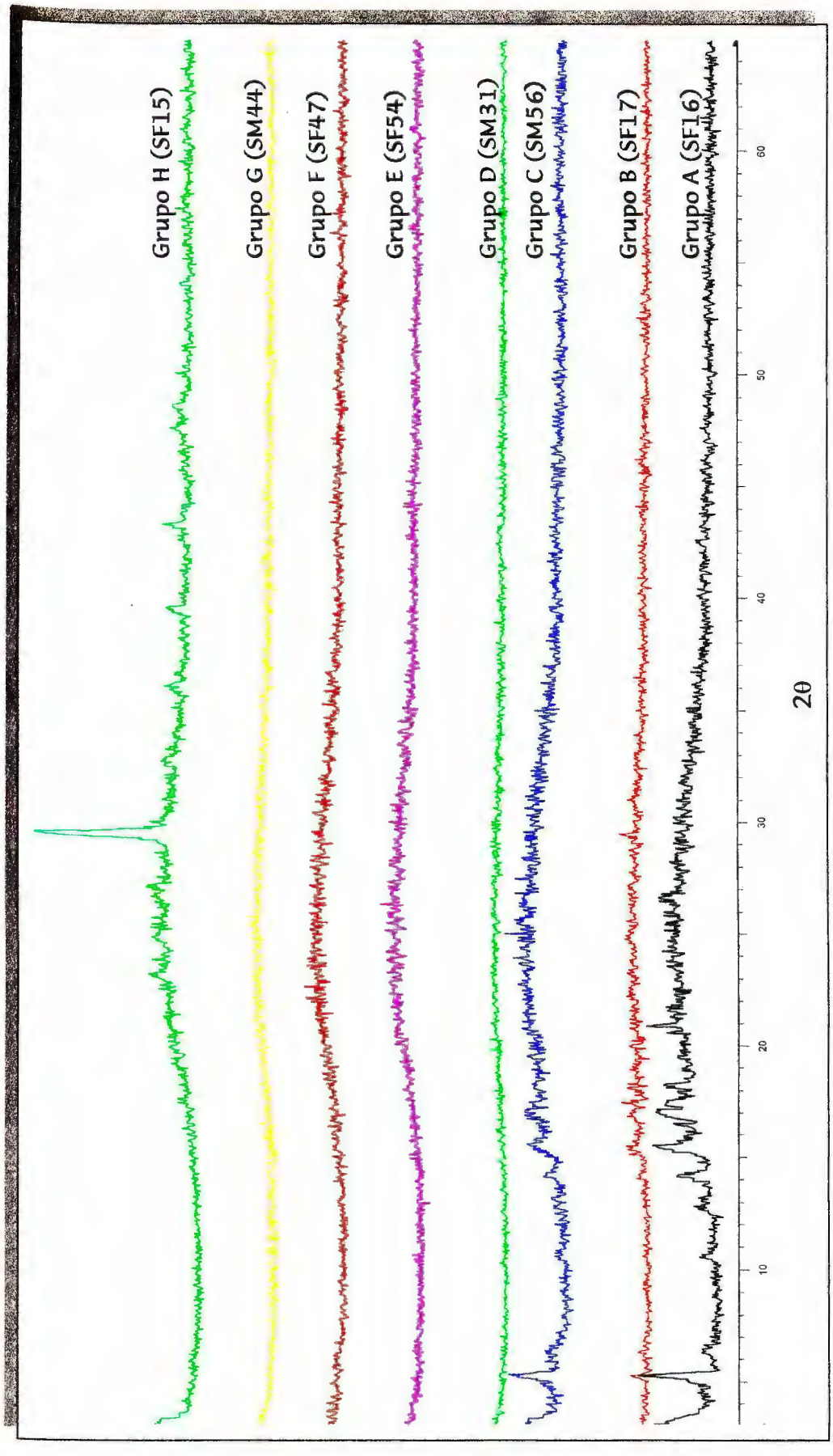

Figura IV.44 - Sobreposição dos difratogramas de raios X das amostras de cálculos biliares, pertencente aos grupos A, B, C, D, E, F, G e H, obtidos utilizando o método do pó.

IV.3. ESTUDO TERMOANALÍTICO

Neste item será relatado o estudo termoanalítico das amostras de cálculos biliares e bile humana, dos mesmos pacientes, classificados em oito grupos distintos. As condições experimentais adotadas para obtenção das curvas TG/DTG e DSC foram detalhadas no item III.2.3.2.1 do capítulo de material e métodos. Inicialmente, serão abordados os aspectos do comportamento térmico dos compostos padrões que fazem parte do processo metabólico biliar uma vez que os perfis das curvas termoanalíticas dessas substâncias podem auxiliar, na caracterização das amostras de cálculo e bile, que estão sob estudo. Em seguida, serão discutidos os resultados termoanalíticos referentes as amostras de cálculos biliares e biles; para tal, foi escolhida uma única amostra de cálculo biliar e a bile correspondente como representativa de cada grupo.

Todos os dados obtidos por Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) serão correlacionados entre si e com os resultados da caracterização físico-química obtidos por análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e difração de raios X, os quais foram relatados nos itens anteriores.

No caso das amostras de cálculos biliares que apresentaram carbonato de cálcio ($CaCO_3$) na sua composição, foi realizado um teste analítico qualitativo, adicionado-se algumas gotas de HCl (10%). Visualmente, observou-se o borbulhamento, que é característico da liberação de CO_2, formado pela reação do $CaCO_3$ com o respectivo ácido.

IV.3.1. COMPOSTOS PADRÕES QUE FAZEM PARTE DO PROCESSO METABÓLICO DOS PIGMENTOS BILIARES:

IV.3.1.1. COLESTEROL:

As curvas TG/DTG do padrão de colesterol indicam que essa substância apresenta estabilidade térmica de aproximadamente 200°C. Acima

dessa temperatura sofre decomposição térmica em duas etapas bem definidas. A primeira que envolve perda de massa de 84,43% e ocorre entre 204 a 400°C. Decomposição relativamente rápida e pode ser atribuida à quebra de ligações, dehidroxilação e queima da matéria orgânica com a conseqüente carbonização da amostra. A segunda, com perda de massa mais lentamente cerca de 600°C, com variação de 15,55% em relação a massa inicial e correspondente à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior. Nenhum outro evento foi observado acima de 600°C, uma vez que nessa temperatura o processo de decomposição térmica foi total (Tabela IV. 14 e Figura IV.45).

A curva DSC evidencia quatro eventos térmicos principais. Os dois primeiros são de origem física, pois ocorrem numa faixa de temperatura onde as curvas TG/DTG não revelam variações de massa. Segundo LOOMIS *et alii* (1974) o colesterol anidro apresenta uma transição cristalina polimórfica que aparece na curva DSC indicada por um pico no sentido endotérmico próximo a 45°C. No nosso caso, o evento associado a essa transição, aparece entre 34 e 56°C. Já o segundo evento, também endotérmico, ocorre na faixa de 144 a 160°C com temperatura onset de 147°C e $\Delta H_s^l \approx 73{,}4\ J/g$ (entalpia de fusão). Está associado ao processo de fusão do colesterol, concordante com a temperatura de fusão encontrada na literatura (MERCK, 1989). Após a fusão do material, inicia-se o processo de decomposição térmica acima de 180°C, evidenciado na curva DSC como um pico no sentido endotérmico (temperatura do pico 314°C associada ao terceiro evento) e correspondente ao início da perda de massa indicada nas curvas TG/DTG. O fato do processo de decomposição térmica ocorrer de forma relativamente rápida, torna-o favorável mesmo em atmosfera inerte, por isso, são observados eventos consecutivos no sentido exotérmico na curva DSC, em concordância com as etapas de perda de massa originadas nas curvas TG/DTG.

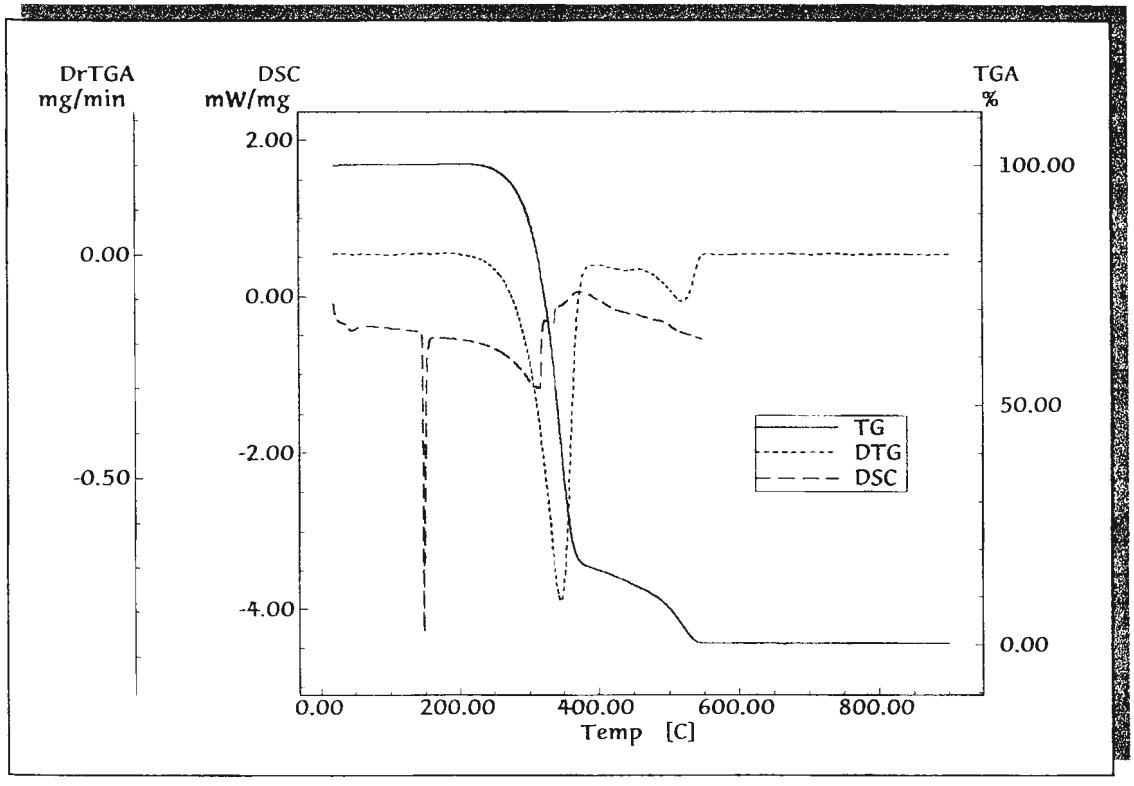

Figura IV.45 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do colesterol.

IV.3.1.2. ÁCIDO CÓLICO:

As curvas TG/DTG do padrão do ácido cólico, apresentam perfis similares àqueles do colesterol, porém com os eventos deslocados para temperaturas maiores. Essa substância é termoestável até aproximadamente 238°C e apresenta duas etapas de perdas de massa bem definidas. A primeira, ocorre entre 238 a 400°C, com uma variação em relação à massa inicial de 86,42%. O processo térmico ocorre de forma relativamente rápida e corresponde à etapa principal de decomposição térmica, que pode ser associada à quebra de ligação, devido ao processo de dehidroxilação e descarboxilação e, também, à queima da matéria orgânica com a conseqüente carbonização. Em seguida, ocorre uma perda de massa mais lenta até cerca de 600°C, apresentando uma variação 12,05%, correspondente à queima do material carbonáceo formado na etapa

anterior. Nenhum outro evento acima de 600°C pôde ser observado, como conseqüência da perda de massa total (Tabela IV. 14 e Figura IV.46).

A curva DSC evidencia três eventos térmicos principais: os dois primeiros endotérmicos e o último exotérmico. O primeiro ocorre de 185 a 216°C com temperatura onset de 198°C e valor de ΔH_s^l de 100,6 J/g (entalpia de fusão), e correspondente ao processo de fusão desse material; já o segundo e o terceiro eventos, um endotérmico seguido do outro exotérmico, ocorrem de 315 a 600°C, coerentes com as duas etapas de perda de massa observadas nas curvas TG/DTG e características do processo de decomposição desse ácido (Figura IV.46).

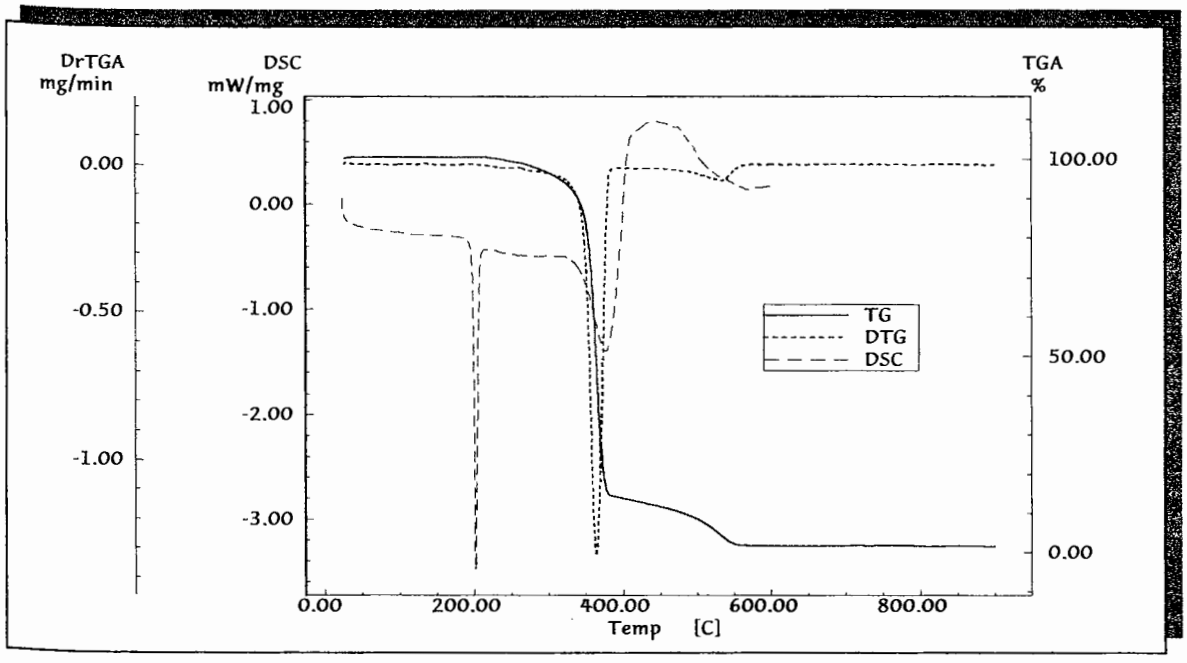

Figura IV.46 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido cólico.

IV.3.1.3. ÁCIDO DEOXICÓLICO:

As curvas TG/DTG do padrão do ácido deoxicólico mostram que essa substância é termoestável até 217°C, porém, que sofre acima dessa temperatura decomposição térmica em duas etapas bem definidas. O primeiro evento de perda de massa, ocorre aproximadamente na faixa de temperatura de 217 a 440°C, e corresponde a uma variação de 80,19%, em relação a massa inicial. Similarmente, ao caso anterior, o processo térmico ocorre de forma rápida e corresponde à

decomposição térmica devido à quebra de ligação, e ao processo de dehidroxilação e descarboxilação bem como à queima de matéria orgânica com a conseqüente carbonização. A última etapa de perda de massa, ocorre mais lentamente e finaliza-se em 600°C com variação de 19,64%, correspondente à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior. Nenhum outro evento acima de 600°C pôde ser observado como conseqüência da perda de massa total (Tabela IV. 14 e Figura IV.47).

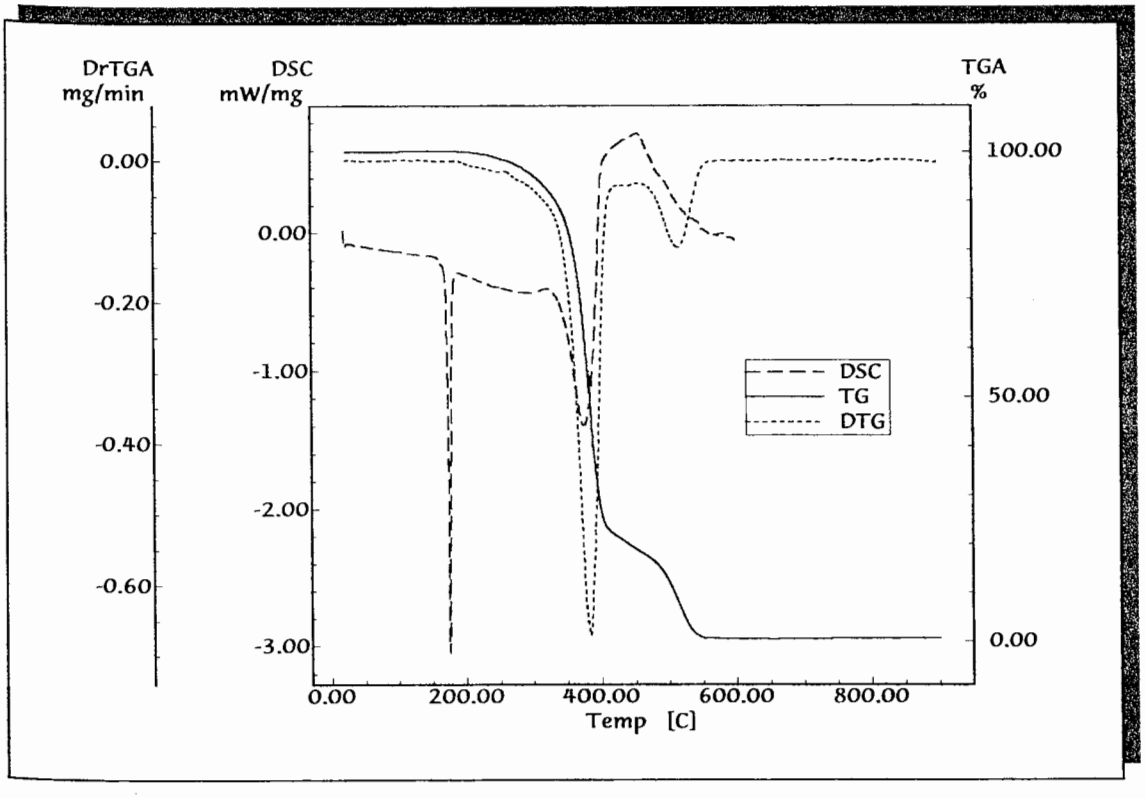

Figura IV.47 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido deoxicólico.

A curva DSC evidencia três eventos térmicos principais, dois endotérmicos e um exotérmico. O primeiro, endotérmico ocorre na faixa de 164 a 189°C e apresenta temperatura onset de 172°C e ΔH_s^1 de 77,6 J/g (entalpia de fusão), correspondente ao processo de fusão dessa substância. Todavia, o segundo e o terceiro, eventos endotérmicos e exotérmico, respectivamente, ocorrem na faixa de temperatura entre 320 e 600°C. São característicos do

processo de decomposição desse ácido e estão em concordância com as duas etapas de perda de massa observadas nas curvas TG/DTG (Figura IV.47).

IV.3.1.4. ÁCIDO QUENODEOXICÓLICO:

As curvas TG/DTG do padrão do ácido quenodeoxicólico, indicam a termoestabilidade da substância até aproximadamente 208°C, e decomposição térmica em duas etapas bem definidas entre 208 e 600°C. O primeiro evento, ocorre na faixa de temperatura de 208 a 416°C e corresponde a uma rápida perda de massa de 84,29% que está associada à decomposição térmica da substância devido à quebra de ligação e ao processo de dehidroxilação e descarboxilação e, também, à queima de matéria orgânica com a conseqüente carbonização do material. Em seguida, a perda de massa é de 14,10% e ocorre de forma mais lenta até cerca de 600°C, e é correspondente à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior. Nenhum outro evento acima de 600°C pode ser observado, uma vez que a perda de massa foi total (Tabela IV. 14 e Figura IV.48).

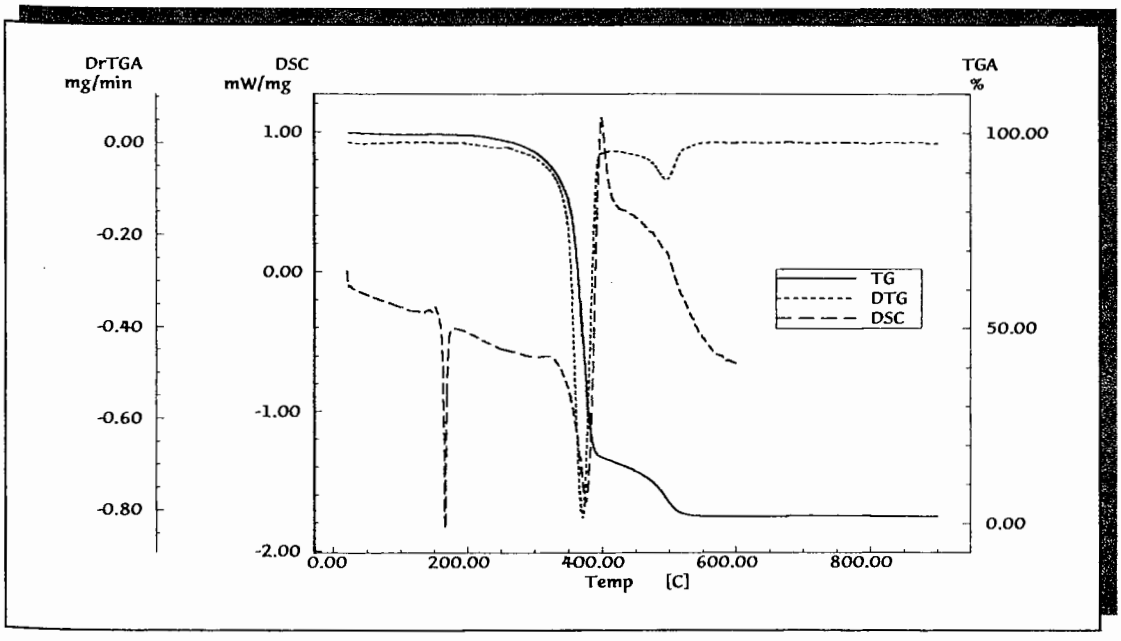

Figura IV.48 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido quenodeoxicólico.

A curva DSC evidencia três eventos térmicos principais, dois endotérmicos e um exotérmico. O primeiro, endotérmico ocorre entre 151 a 179°C e apresentam temperatura onset de 162°C e ΔH_s^l de 48,2 J/g (entalpia de fusão), e está associado ao processo de fusão desse material. No entanto, o segundo e o terceiro, respectivamente, eventos endotérmico e exotérmico, ocorrem na faixa de temperatura de 313 a 600°C, os quais são característicos do processo de decomposição desse ácido e estão em concordância com as duas etapas de perda de massa observadas nas curvas TG/DTG (**Figura IV.48**).

IV.3.1.5. ÁCIDO LITOCÓLICO:

As curvas TG/DTG do padrão do ácido litocólico indicam que está substância é termoestável até aproximadamente 220°C e que se decompõe térmicamente entre 220 a 600°C em duas etapas principais. O primeiro evento com perda de massa de 74,07%, ocorre rapidamente entre 220 a 397°C e corresponde à decomposição térmica por causa da quebra de ligação, ao processo de dehidroxilação e descarboxilação bem como à queima de matéria orgânica com a conseqüente carbonização. Em seguida, ocorrem duas perdas de massas consecutivas, conforme indicada claramente na curva DTG, uma até 473°C e a outra até cerca de 600°C, apresentando uma variação de massa de 7,53 e 16,64%, respectivamente, e correspondente à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior. Nenhum outro evento acima de 600°C pode ser observado, obtendo uma perda de massa total (**Tabela IV. 14** e **Figura IV.49**).

A curva DSC evidencia quatro eventos térmicos principais, dos quais os três primeiros são picos endotérmicos e, o último é exotérmico. O primeiro evento ocorre entre 167 a 201°C e apresenta temperatura onset de 178°C e ΔH_s^l de 91,3 J/g (entalpia de fusão), e corresponde ao processo de fusão desse material. O segundo e terceiro são eventos endotérmicos consecutivos e ocorrem entre 327 a 387°C e correspondente a etapa principal de decomposição térmica. O último evento é exotérmico e ocorre na faixa de 387 a 600°C; caracteriza a eliminação do material carbonáceo formado nas etapas anteriores. Esses eventos

de decomposição térmica e estão em concordância com as duas etapas de perda de massa observadas nas curvas TG/DTG (Figura IV.49).

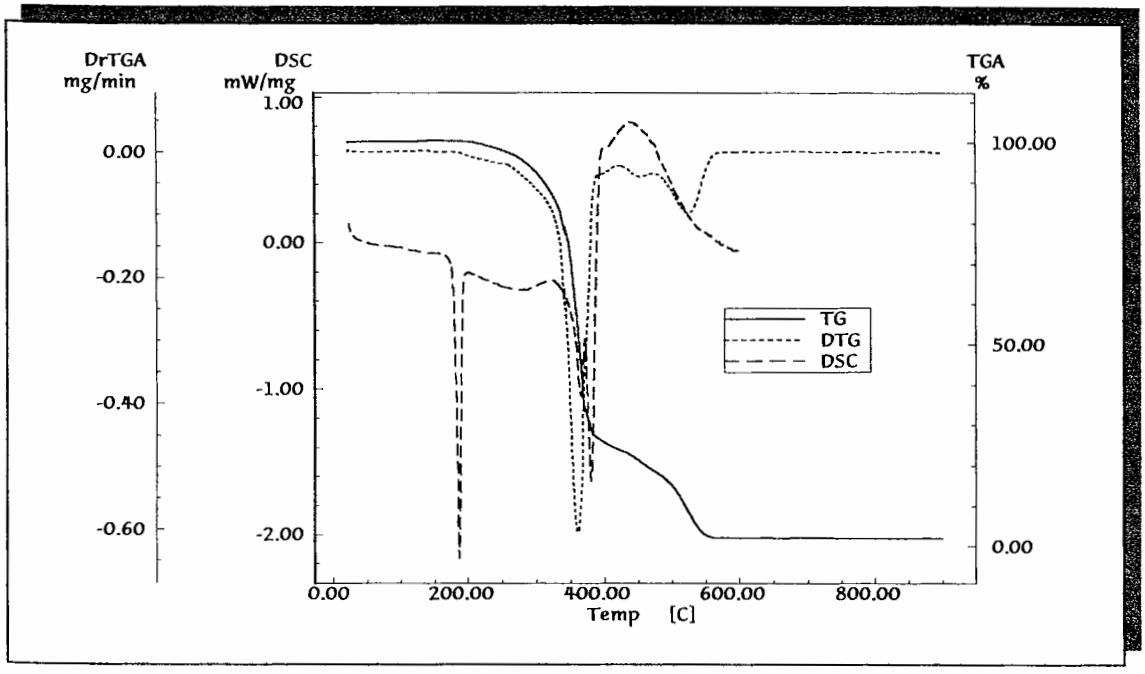

Figura IV.49 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do ácido litocólico.

IV.3.1.6. ÉSTER METÍLICO DE ÁCIDO CÓLICO:

As curvas TG/DTG do padrão do éster metílico de ácido cólico indicam que essa substância é termoestável até 247°C e se decompõe termicamente entre 247 e 600°C em duas etapas principais bem definidas. O primeiro evento, com perda de massa de 81,54%, ocorre entre 247 e 422°C, de forma relativamente rápida e corresponde à decomposição térmica causada pela quebra de ligação e pelo processo de dehidroxilação e desesterificação e à queima da matéria orgânica, com a conseqüente carbonização. A última etapa de perda de massa ocorre de forma mais lenta até cerca de 600°C, e corresponde à variação de 17,13% em relação à massa inicial, e pode ser atribuída à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior e, nenhum outro evento acima de 600°C

pode ser observado, uma vez que a perda de massa é total (Tabela IV. 14 e Figura IV.50).

A curva DSC evidencia cinco eventos térmicos principais, nos quais o primeiro, terceiro e quarto são caracterizados picos endotérmicos e ocorrem nas faixas de temperaturas de: 33 a 61°C; 135 a 163°C e 199 a 357°C, respectivamente. O segundo e quinto são exotérmico e ocorrem nas seguintes faixas: de 112 a 132°C e de 357 a 600°C. O primeiro e segundo eventos são característicos de transições cristalinas enquanto o terceiro, que apresenta temperatura onset de 147,8°C e formato agudo do pico, numa faixa estreita de temperatura (ΔH_s^I = 58,9 J/g) é atribuido ao processo de fusão dessa substância. Esses três eventos térmicos são de origem física porque ocorrem numa faixa de temperatura na qual as curvas TG/DTG não mostram perda de massa. No entanto, os dois últimos eventos, o quarto, endotérmico, seguido do quinto, exotérmico, caracterizam o processo de decomposição térmica desse material e estão em concordância com os resultados de TG/DTG, o que pode ser observado com a sobreposição das curvas (Figura IV.50).

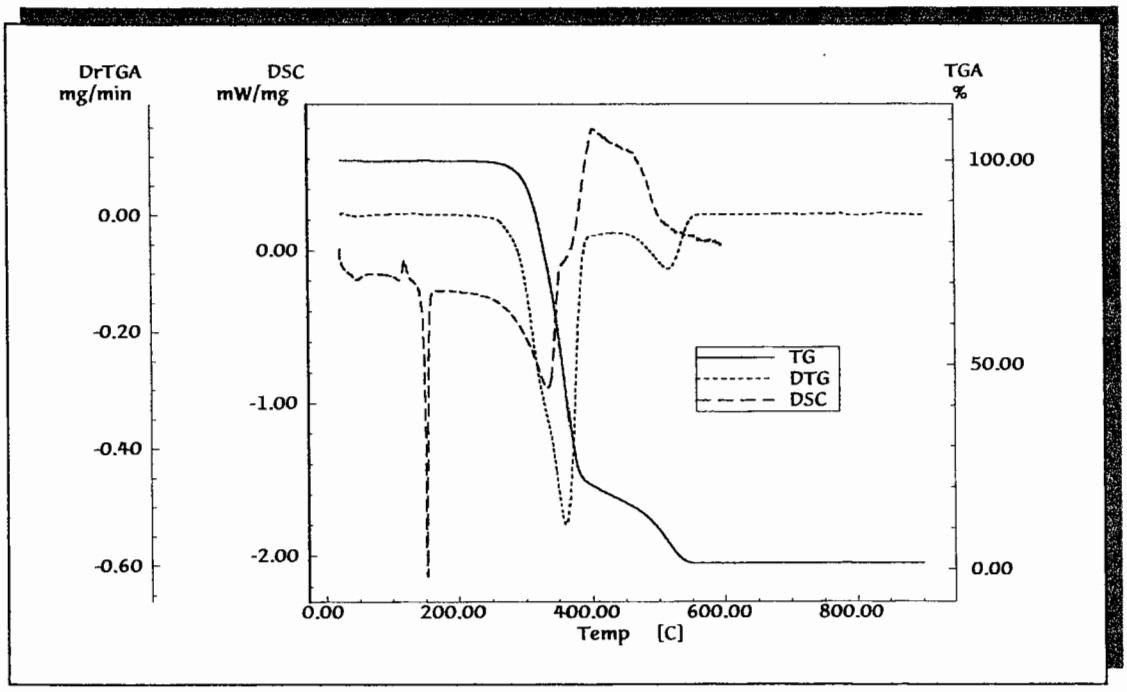

Figura IV.50 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do éster metílico de ácido cólico.

IV.3.1.7. SAIS BILIARES (COLATO DE SÓDIO E DEOXICOLATO DE SÓDIO):

As curvas TG/DTG do padrão de sais biliares, caracterizam seis etapas de perda de massa diferentes. O primeiro evento ocorre entre 38 e 160°C e corresponde a uma variação de massa de 7,35%, característica do processo de desidratação do material. Em seguida, na faixa de temperatura de 330 a 460°C, observa-se a decomposição térmica do material anidro que ocorre por três eventos consecutivos, e com variação total de massa de 66,71%. Essa etapa de decomposição térmica ocorre pela quebra de ligações e pelo processo de dehidroxilação e descarboxilação e pela queima da matéria orgânica com a conseqüente carbonização. Pelo fato de se tratar de sais de sódio, certamente nessa etapa forma-se Na_2CO_3. O quinto evento evidencia uma perda de massa mais lenta, na faixa de 515 a 695°C, com uma variação de 5.94%, em relação à massa inicial e correspondente à queima do material carbonáceo, formado nas etapas anteriores. O último evento, também, apresenta uma perda de massa mais lenta e ocorre na faixa de 695 a 900°C, com uma variação de 10,18% e pode ser atribuído à decomposição e/ou volatilização de carbonato de metais alcalinos (Tabela IV. 14 e Figura IV.51).

A curva DSC evidencia quatro eventos térmicos distintos. O primeiro, corresponde a um pico no sentido endotérmico, formado desde a temperatura ambiente até 150°C é devido à desidratação do sal. O segundo, um evento exotérmico, que ocorre entre 193 a 232°C [temperatura onset de 204°C e ΔH_s^l de 37,1 J/g (entalpia de fusão)] e corresponde a uma transição cristalina, uma vez que nas curvas TG/DTG, não há evidências de perdas de massa nesse intervalo de temperatura. Os dois últimos eventos, ocorrem na faixa de 345 a 550°C um endotérmico seguido de outro exotérmico, derivados da decomposição térmica desse material, e estão em concordância com as curvas TG/DTG que evidenciam, nessa faixa de temperatura, grande variação de massa (Figura IV.51).

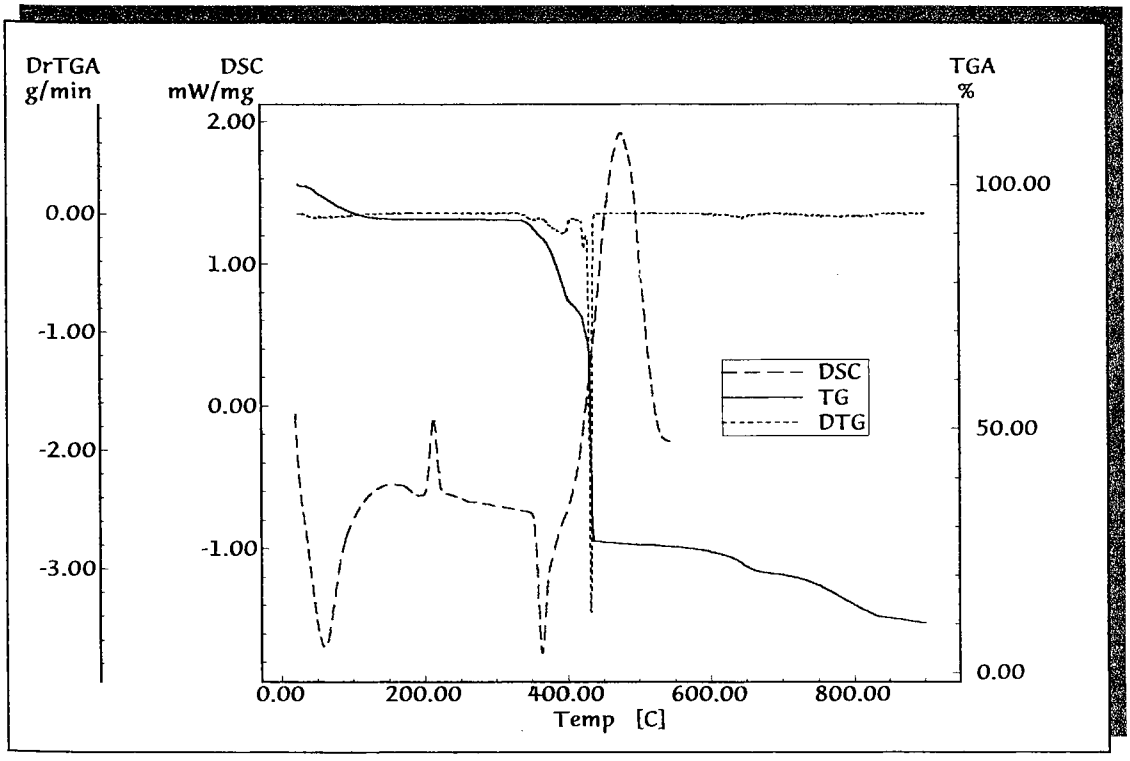

Figura IV.51 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão dos sais biliares.

IV.3.1.8. BILIRRUBINA:

As curvas TG/DTG do padrão de bilirrubina caracterizam um comportamento térmico complexo. Inicialmente o material é termoestável até aproximadamente 160°C. Entre 160 até 260°C, o evento de perda de massa, com variação de 1,8%, ocorre lentamente na faixa de temperatura de 260 a 312°C, há uma perda de massa de 23%, que ocorre de forma relativamente rápida em relação aos outros eventos e pode ser atribuída ao início da decomposição térmica desse material com quebra de ligação e à queima de matéria orgânica com a conseqüente carbonização. A útima etapa da decomposição térmica ocorre lentamente entre 312 e 700°C e, corresponde a uma perda de massa de 71,72% que pode ser atribuída à continuidade do processo de decomposição térmica e à queima do material carbonáceo que se forma. Nenhum outro evento acima de

700°C pode ser observado, uma vez que a perda de massa foi total (Tabela IV. 14 e Figura IV.52).

A curva DSC evidencia dois eventos exotérmicos, que ocorrem consecutivamente entre 280 e 330°C e 330 e 530°C, respectivamente. Esses picos correspondem à decomposição térmica do material, confirmada pela sobreposição das curvas TG/DTG/DSC (Figura IV.52).

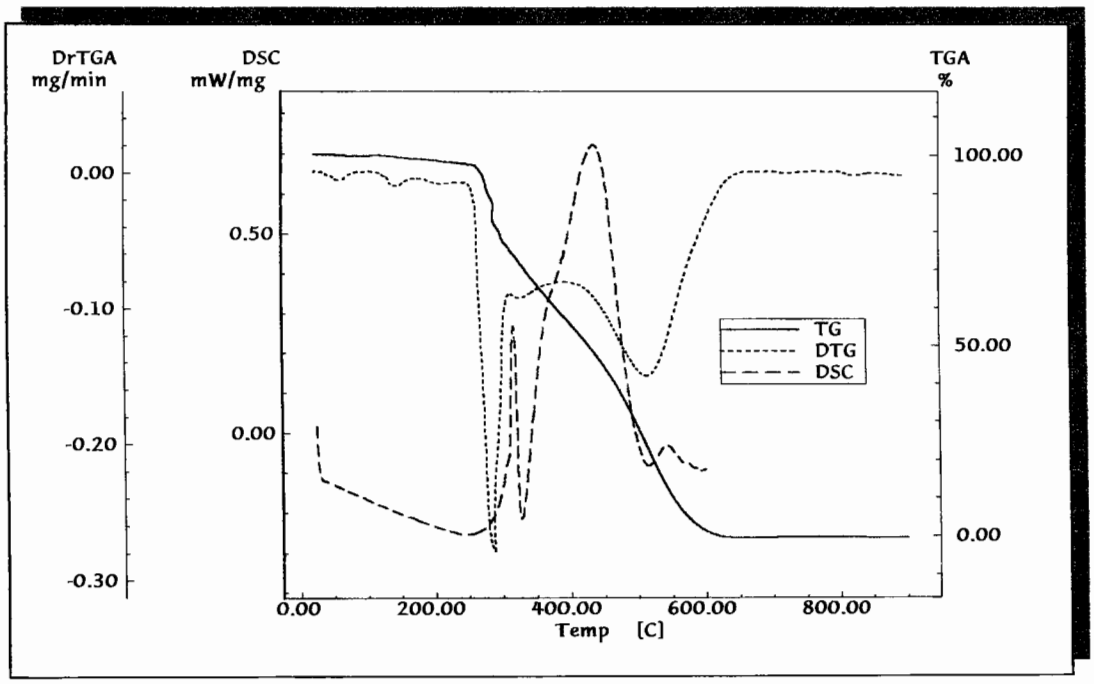

Figura IV.52 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão da bilirrubina.

IV.3.1.9. BILIRRUBINATO DE CÁLCIO:

As curvas TG/DTG da amostra de bilirrubinato de cálcio, sintetizada segundo o método proposto por EDWARDS *et alii* (1958), indicam um processo térmico complexo para essa substância. Inicialmente, observa-se uma perda de massa de 2,57% que ocorre lentamente desde a temperatura ambiente até 150°C, e corresponde ao processo de desidratação do material. O evento principal de decomposição térmica apresenta perdas de massa em etapas consecutivas entre

218 a 543°C e variação de massa de aproximadamente 78,5% e que está associada à quebra de ligações, à descarboxilação e à queima de matéria orgânica para formação do $CaCO_3$. O último evento, ocorre entre 543 e 700°C, com a variação de massa de 6,43% e é indicativo da decomposição térmica do $CaCO_3$ formado nas etapas anteriores (**Tabela IV. 14** e **Figura IV.53**). Considerando-se que, nessa etapa, o volátil liberado corresponde a CO_2, pode-se estimar o teor de $CaCO_3$ (14,61%), bilirrubinato de cálcio (90,98%) e do CaO formado (8,18%). Essas percentagens sugerem que essa amostra sintetizada apresenta alguma impureza que é termoestável, possivelmente, NaOH, que foi utilizado no processo de síntese, cuja presença foi indicada pelo espectro de absorção na região do infravermelho deste material.

A curva DSC evidencia três eventos. O primeiro é endotérmico e ocorre da temperatura ambiente até 82°C e corresponde à desidratação do material. O segundo e terceiro são exotérmicos e ocorrem consecutivamente entre 311 e 470°C. Esses eventos correspondem à decomposição térmica do material, conforme observado na sobreposição das curvas TG/DTG/DSC (**Figura IV.53**).

As **Figuras IV.54** e **IV.55**, mostram o perfil termoanalítico das curvas TG e DSC de todos os padrões utilizados nesse estudo. Destaca-se, a similaridade dos perfis das curvas TG do colesterol e dos ácidos primários (cólico e quenodeoxicólico) e secundários (deoxicólico e litocólico), assim como o delocamento da temperatura de fusão dos mesmos, observada nas curvas DSC.

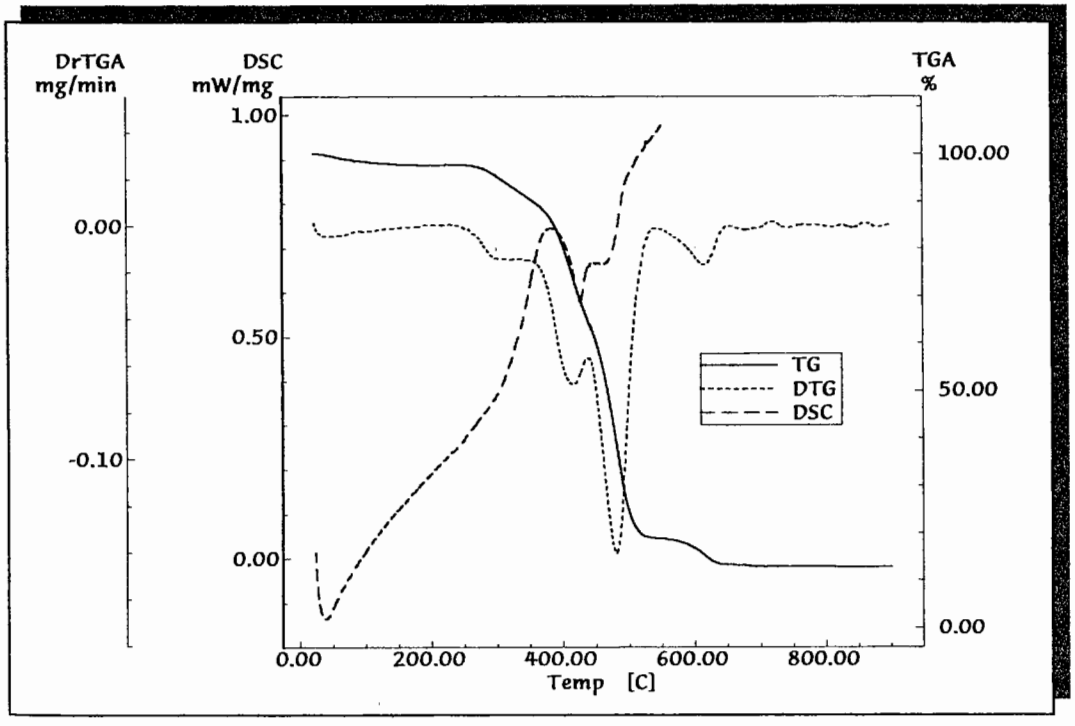

Figura IV.53 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC do padrão do bilirrubinato de cálcio.

TABELA IV.14 - Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição dos padrões, obtidos através das curvas TG/DTG.

Padrões	Temperatura de decomposição (°C)	Δm_1 (%)	Δm_2 (%)	Δm_3 (%)	Δm_4 (%)	Δm_5 (%)	Produto Final (%)
Colesterol	203	84,43	15,55	-	-	-	0,02
Bilirrubina	222	1,80	26,22	71,72	-	-	0,26
Bilirrubinato de cálcio	217	2,57	7,07	25,08	46,30	6,43	12,54
Sais Biliares	326	7,35	17,81	48,90	5,94	10,18	10,12
Ácido Cólico	238	86,42	12,05	-	-	-	1,53
Ácido Quenodeoxicólico	208	84,29	14.10	-	-	-	1,60
Ácido Deoxicólico	216	80,19	19,64	-	-	-	0.16
Ácido Litocólico	220	74,07	7,53	16,64	-	-	2,07
Éster metílico de ácido cólico	247	81,54	17,13	-	-	-	1,33

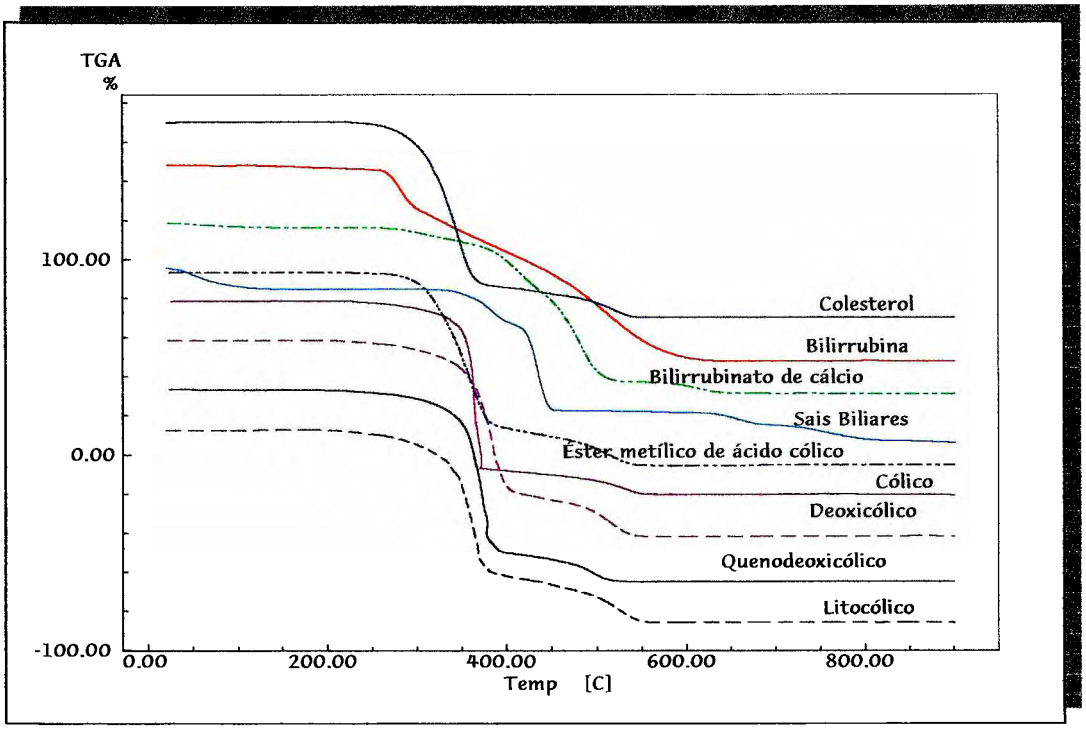

Figura IV.54 - Sobreposição das curvas TG dos padrões que fazem parte do processo metabólico dos pigmentos biliares.

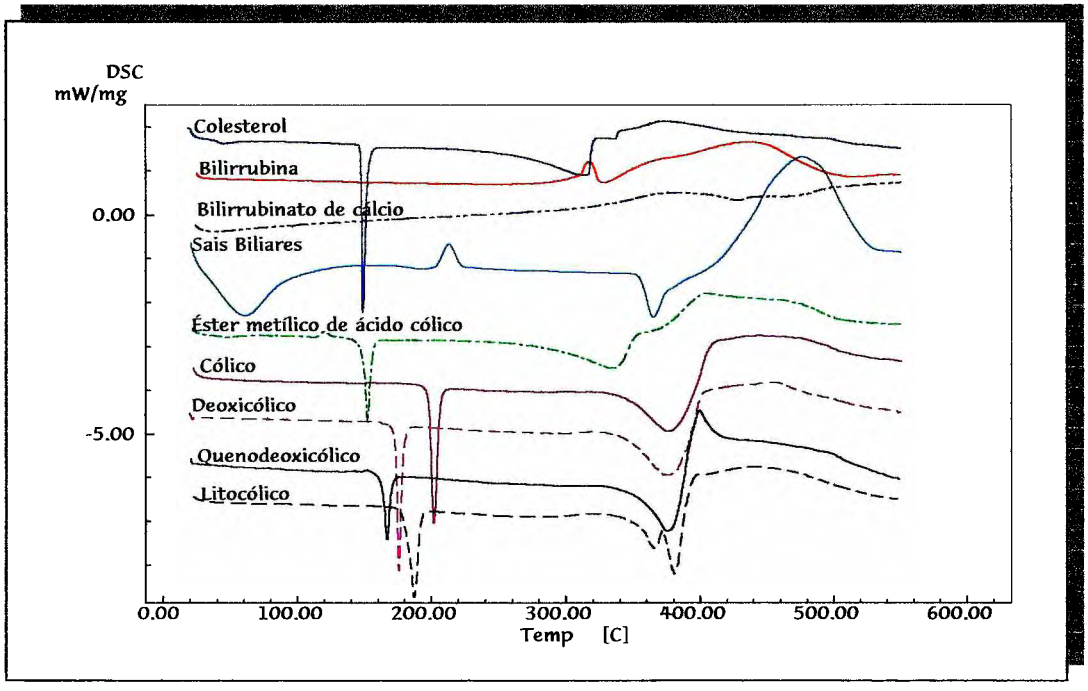

Figura IV.55- Sobreposição das curvas DSC dos padrões que fazem parte do processo metabólico dos pigmentos biliares.

IV.3.2. AMOSTRAS DE CÁLCULOS BILIARES E BILE QUE FAZEM PARTE DA NOVA CLASSIFICAÇÃO BILIAR

IV.3.2.1. GRUPO A

As curvas TG/DTG das amostras de cálculos biliares pertencentes ao grupo A indicam que estas são termoestáveis até aproximadamente 198°C e que sofrem decomposição térmica em duas etapas bem definidas. A amostra SF16 foi escolhida como representativa desse grupo. O primeiro evento de perda de massa, com variação em torno de 78,77%, ocorre entre 198 e 391°C de forma relativamente rápida e corresponde à decomposição térmica causada pela quebra de ligações e pela queima de matéria orgânica. Em seguida, ocorre uma perda de massa mais lenta com variação em torno de 17,23% até cerca de 600°C, que corresponde à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior. Nenhum outro evento acima dessa temperatura pode ser observado (Tabela IV.15).

A curva DSC da amostra de cálculos biliar SF16 evidencia quatro eventos distintos, cujos três primeiros são endotérmicos e o último, exotérmico. O primeiro evento ocorre na faixa de temperatura de 33 a 58°C e corresponde à transição cristalina conforme LOOMIS et alii (1979) para a amostra de colesterol. Já, o segundo evento ocorre entre 139 e 158°C com temperatura onset de 144,8°C e ΔH_s^l de 61,8 J/g e está associado ao processo de fusão da amostra. A comparação da curva DSC com aquelas de TG/DTG indica claramente que estes dois primeiros eventos ocorrem numa faixa de temperatura em que não se observa perda de massa. O terceiro e quarto eventos são, respectivamente, endotérmico e exotérmico e ocorrem aproximadamente entre 180 e 550°C e são características da decomposição térmica desse material (Figura IV.56).

A Figura IV.56, mostra a sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF16, representativa desse grupo. No apêndice, podem ser encontradas as Figuras IV.59 a IV.102, que mostram as sobreposições das curvas TG/DTG e DSC de todas as amostras de cálculos biliares e bile,

pertencentes a esse grupo. Ao comparar os perfis das curvas TG/DTG e DSC do padrão de colesterol com aquelas das amostras classificadas como grupo A, observou-se grande similaridade entre esses materiais. Os teores de perda de massa, a temperatura e a entalpia de fusão, são características do colesterol (Tabela IV.14, IV.16 e Figura IV.45).

Com relação às amostras de bile, observou-se que os perfis das curvas TG/DSC foram bastante complexos e distintos das amostras de cálculos biliares, pertencente ao mesmo paciente (Figura IV.58), impossibilitando sua interpretação. No entanto, ao comparar os perfis das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF16 (Figura IV.57) com o padrão dos sais biliares (Figura IV.51), observou-se uma etapa de perda de massa entre 700 e 900°C, que caracteriza a presença de sais biliares nessa amostra, confirmando a identificação do mesmo realizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

Com base em toda caracterização termoanalítica e físico-química, vista anteriormente, e comparando com o resultados obtidos dos padrões, pode-se dizer que todas as amostras pertencentes a esse grupo apresentam cálculos biliares rico em colesterol. A Tabela IV.16 lista os dados de DSC (T_{onset}, T_{pico} e $\Delta H_s^!$) referentes ao evento endotérmico que caracteriza o processo de fusão indicativo da presença de colesterol num determinado tipo de cálculo biliar. Os espectros de absorção na região do infravermelho e os teores de nitrogênio encontrados por análise elementar, para algumas amostras, sugerem a presença de bilirrubinato, embora numa primeira avaliação se tenham considerado essas amostras pertencentes ao mesmo grupo.

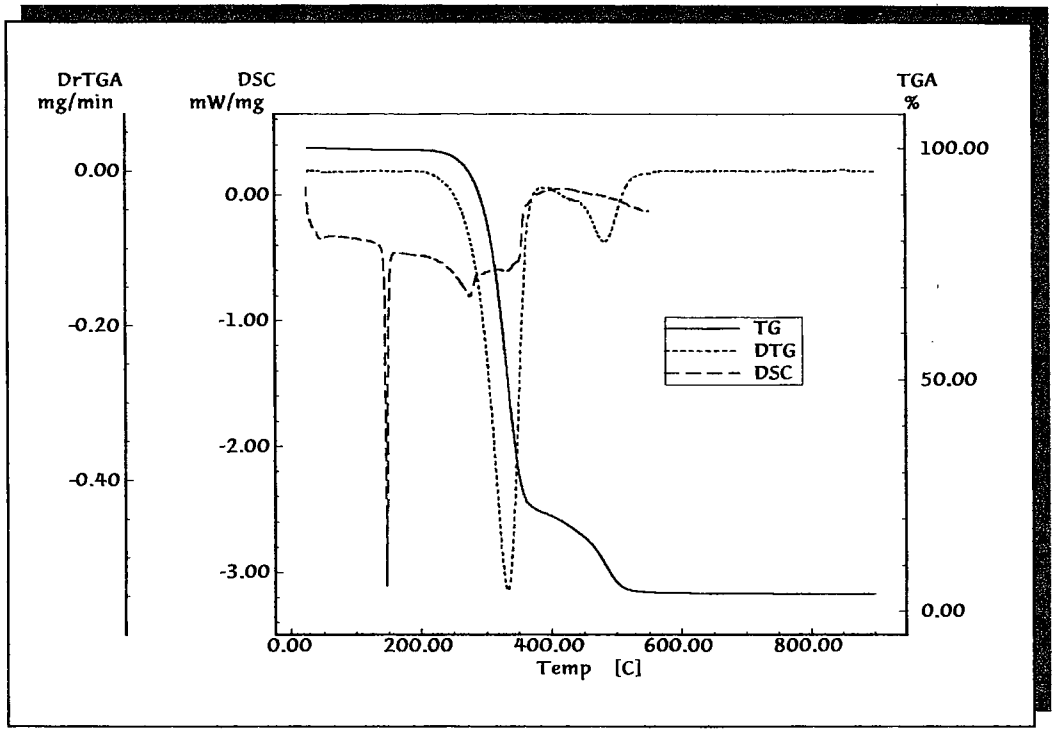

Figura IV.56 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF16, pertencente ao grupo A.

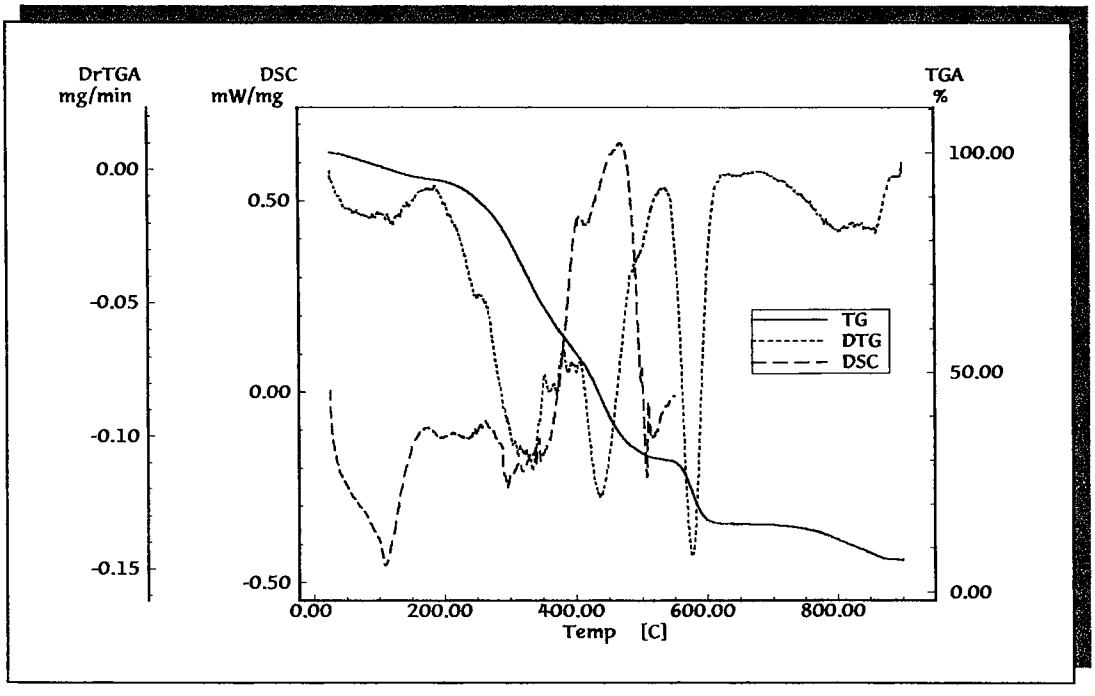

Figura IV.57 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar BF16, pertencente ao grupo A.

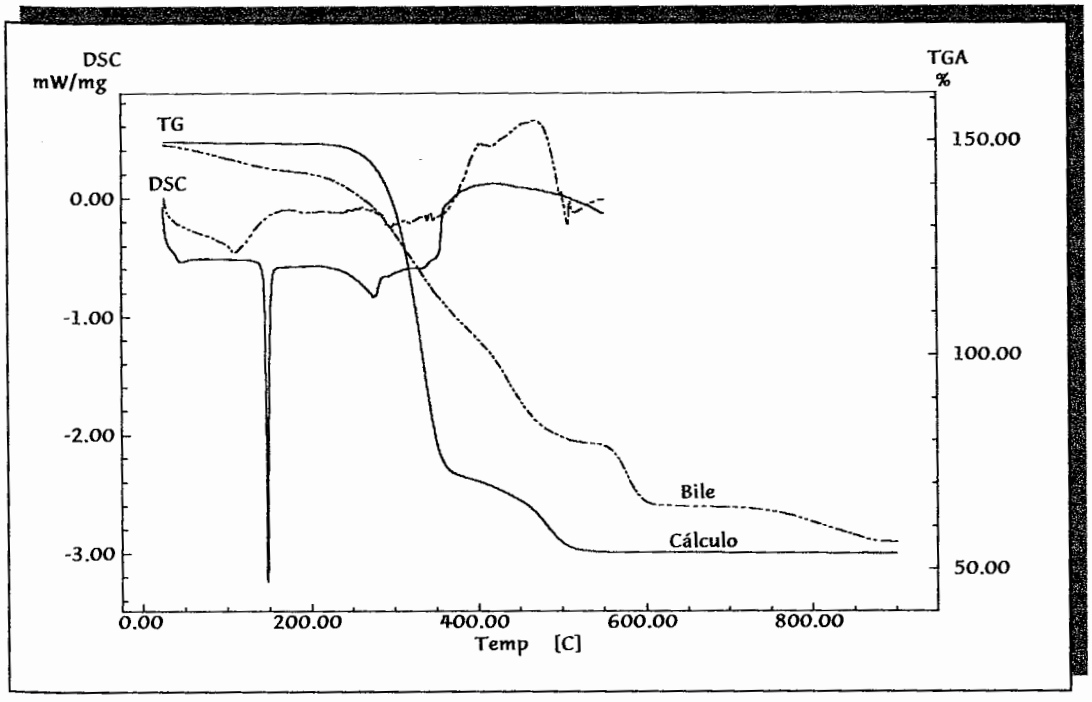

Figura IV.58 - Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SF16 e bile BF16, pertencentes ao grupo A.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

TABELA IV.15 - Dados de variação de massa (Δm) e temperatura de decomposição das amostras de cálculos biliares, pertencentes aos grupos A a H, obtidos através das curvas TG/DTG.

Grupo	Amostra	Temperatura de decomposição (°C)	Δm_1 (%)	Δm_2 (%)	Δm_3 (%)	Δm_4 (%)	Produto Final (%)
A	SF3	195	77.84	20.86	-	-	1.30
	SF4	206	80.32	17.88	-	-	1.80
	SF7	201	79.33	17.02	-	-	3.65
	SF8	209	82.67	16.54	-	-	0.79
	SF9	200	81.59	16.17	-	-	2.24
	SM10	204	79.64	18.94	-	-	1.41
	SF12	210	85.00	14.59	-	-	0.41
	SM13	204	81.29	16.38	1.01	-	1.32
	SF14	200	84.96	14.26	-	-	0.77
	SF16	206	78.77	17.23	-	-	3.99
	SM18	204	82.54	15.23	-	-	2.22
	SF26	201	79.49	19.44	-	-	1.06
	SF27	204	78.71	19.86	-	-	1.43
	SF32	195	78.34	18.92	-	-	2.74
	SF36	200	79.75	19.38	-	-	0.87
	SF39	204	73.70	23.50	-	-	2.68
	SF40	196	80.09	18.40	-	-	1.51
	SF41	204	84.35	14.96	-	-	0.68
	SF45	200	83.22	16.54	-	-	0.23
	SF46	202	86.99	12.28	-	-	0.73
	SF50	196	80.06	18.98	-	-	0.96
	SF53	198	79.74	17.76	-	-	2.43
	SF55	196	79.92	18.21	-	-	1.78
	SF57	196	81.40	17.68	-	-	0.91
B	SF1	190	70.43	19.76	2.84	-	6.97
	SF5	202	75.71	20.48	0.92	-	2.89
	SF17	198	68.25	9.81	9.29	-	12.66
	SM22	202	74.09	17.32	3.15	-	5.43
	SF25	208	44.37	8.40	20.43	-	26.79
	SF35	198	68.47	13.55	7.64	-	10.30
	SM51	196	69.02	25.48	1.52	-	3.95
C	SF37	190	70.80	22.25	-	-	6.88
	SF59	202	77.69	18.11	-	-	4.02
	SM58	180	1.76	64.00	33.48	-	0.61
D	SM31	182	8.77	36.22	33.18	13.27	8.56
	SM56	190	7.21	40.95	39.26	3.46	8.94
E	SF54	124	3.81	44.88	39.92	4.74	6.73
F	SM43	190	2.18	31.46	49.18	5.89	11.33
	SF47	136	2.99	38.68	47.22	2.62	8.48
G	SM44	206	8.20	20.01	11.58	25.82	34.39
H	SF15	208	1.74	11,00	2,90	35,90	51,53

TABELA IV.16 - Dados de temperatura onset (T_{onset}), temperatura do pico (T_{pico}) e entalpia de fusão (ΔH_s^l), obtidos através da curva DSC

Grupo	Amostra	T_{onset} (°C)	T_{pico} (°C)	ΔH_s^l (J/g)
A	SF3	138,5	145,6	52,7
	SF4	142,9	147,7	60,4
	SF7	145,0	148,4	66,8
	SF8	144,9	148,1	66,5
	SF9	143,7	147,7	66,6
	SM10	144,6	148,1	65,3
	SF12	144,3	148,1	67,4
	SM13	145,9	148,4	69,2
	SF14	144,7	147,9	70,5
	SF16	144,8	147,7	63,1
	SM18	144,2	147,9	66,5
	SF26	143,5	147,5	68,1
	SF27	145,0	147,9	68,2
	SF32	143,9	147,6	62,8
	SF36	142,9	147,8	68,2
	SF39	145,7	148,2	63,3
	SF40	143,5	147,9	59,8
	SF41	144,9	148,4	67,4
	SF45	145,5	148,2	69,3
	SF46	143,4	147,5	68,9
	SF50	142,9	148,0	64,7
	SF53	142,6	148,0	63,4
	SF55	143,1	148,0	63,4
	SF57	144,3	148,2	60,6
B	SF1	142,9	146,6	48,5
	SF5	145,4	148,1	65,7
	SF17	143,6	147,8	48,0
	SM22	144,1	147,8	58,2
	SF25	144,1	148,2	51,8
	SF35	144,3	148,3	52,1
	SM51	144,5	147,8	54,9
C	SF37	144,8	148,2	50,7
	SF59	144,6	148,0	62,3
	SM58	144,2	147,7	47,0
D	SM31	-	-	-
	SM56	-	-	-
E	SF54	-	-	-
F	SM43	-	-	-
	SF47	-	-	-
G	SM44	-	-	-
H	SF15	-	-	-

IV.3.2.2. GRUPO B

As curvas TG/DTG das amostras de cálculos biliares pertencentes ao grupo B evidenciam a termoestabilidade das mesmas até a temperatura de 186°C e decomposição térmica em três etapas bem definidas. O primeiro evento de perda de massa com variação em torno de 68,25% ocorre rapidamente na faixa de temperatura de 186 a 394°C, e corresponde à decomposição térmica do material devido à quebra de ligação e queima de matéria orgânica com a conseqüente carbonização. A segunda etapa ocorre mais lentamente entre 394 e 535°C e corresponde a uma variação de massa em torno de 9,81%, atribuída à queima do material carbonáceo formado anteriormente. A terceira etapa de perda de massa ocorre entre 535 e 700°C de forma mais lenta e é correspondente à decomposição térmica de carbonato de cálcio ($CaCO_3$), presente na amostra inicial. O teor de produto final é de 12,66% e corresponde ao óxido de cálcio (CaO) que foi formado após decomposição térmica do $CaCO_3$. Nenhum outro evento acima de 700°C pode ser observado (Tabela IV.15).

As curvas DSC dessas amostras de cálculos biliares, evidenciam três eventos, cujos dois primeiros são endotérmicos e, o último é exotérmico. O primeiro evento ocorre entre 132 e 161°C com temperatura onset de 144,2°C e ΔH_s^l de 48,5 J/g (entalpia de fusão) e corresponde ao processo de fusão, característico da presença de colesterol e explicável porque nas curvas TG/DTG não se observa perda de massa nessa faixa de temperatura. O segundo e terceiro eventos ocorrem de forma consecutivas entre as temperaturas de 220 a 550°C e correspondem ao processo de decomposição térmica desse material (Figura IV.103).

A Figura IV.105, mostra a sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra SF17, representativa desse grupo que, ao comparar com o perfil da curva TG/DTG e DSC do padrão de colesterol (Figura IV.45), pode-se observar que, além do colesterol, essa amostra apresenta, também, o carbonato de cálcio na sua composição. Isto fica claramente confirmado a partir da terceira etapa de

perda de massa que ocorre na faixa de 535 a 700°C, característica da decomposição térmica dessa substância.

Com relação as amostras de bile, observou-se que os perfis das curvas TG/DSC foram bastante complexos e distintos das amostras de cálculos biliares, pertencente ao mesmo paciente (Figura IV.105), impossibilitando sua interpretação. Ao comparar os perfis das curvas TG/DTG da amostra de bile BF17 (Figura IV.104) com aqueles do padrão dos sais biliares (Figura IV.51), evidenciou-se uma etapa de perda de massa entre 700 e 900°C, que caracteriza a presença de sais biliares nessa amostra, confirmando a identificação do mesmo conforme indicado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. As sobreposições das curvas TG/DTG/DSC de todas as amostras de cálculos biliares e bile, pertencentes a esse grupo estão ilustradas nas Figuras IV.106 a IV.117 contidas no Apêndice.

Do ponto de vista termoanalítico e físico-químico, pode-se dizer que as amostras desse grupo apresentam composição química, também rica em colesterol, mas com presença de carbonato de cálcio ($CaCO_3$).

É interessante notar que, a partir dos dados de TG/DTG, associados com as informações oriundas da análise elementar, DSC, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e DRX, é possível estimar os teores dos possíveis constituintes de uma dada amostra de cálculo biliar pertencente ao grupo B.

Tomando como exemplo a amostra SF17, em que as curvas TG/DTG indicam que, nessa terceira etapa de perda de massa, a variação de 9,29% é devido ao CO_2 liberado do $CaCO_3$ existente na amostra inicial, pode-se calcular os teores de $CaCO_3$ e do CaO formado, ou seja:

$CaCO_3$	$\rightarrow$	CaO	+	CO_2
100,08 g/mol		56,08 g/mol		44,01 g/mol
x_1		x_2		9,29% (CO_2 libertado)
x_1 = 21,12% de $CaCO_3$		e x_2 = 11,84% de CaO no produto final		

Observa-se, porém, nas curvas TG/DTG que a percentagem de produto final é de 12,66%. Considerando que este produto é formado unicamente por CaO e descontando-se o percentual de CaO, formado na decomposição do $CaCO_3$, pode-se inferir que os 0,82% de CaO restantes (12,66 - 11,84) é proveniente da decomposição térmica do bilirrubinato de cálcio presente na amostra inicial. Esse percentual de CaO, estequiometricamente, corresponde a 9,11% de bilirrubinato de cálcio, ou seja:

$$C_{33}H_{44}CaN_4O_6 \rightarrow CaO$$

622,71 g/mol 56,08 g/mol

X 0,82%

X = 9,11% de $C_{33}H_{44}CaN_4O_6$

A partir dos dados de DSC, IV e DRX, sabe-se que essa amostra apresenta colesterol. Considerando que, neste cálculo biliar, há apenas esses três componentes, isto é, Colesterol, $CaCO_3$ e $C_{33}H_{44}CaN_4O_6$ e que foi encontrado anteriormente, por cálculo estequiométrico, 21,12% de $CaCO_3$ e 9,11% de $C_{33}H_{44}CaN_4O_6$, o teor de colesterol nesta amostra será de 69,77%. Calculando os teores de C, H e N nessa mistura encontram-se os valores indicados na Tabela IV.17.

Tabela IV 17 - Composição da amostra SF17 e teores de C, H e N calculados a partir dos dados de termogravimetria

Componente	Teor calculado (%)	%C	%H	%N
Colesterol	69,77	58,52	8,36	-
Bilirrubinato de cálcio	9,11	5,80	0,50	0,82
Carbonato de cálcio	21,12	2,53	-	-
Total	100	66,85	8,86	0,82

Os dados de análise elementar, conforme indicados na Tabela IV.2, correspondem a 66,67%C, 9,06%H e 0,84%N, e é concordantes com aqueles encontrados acima.

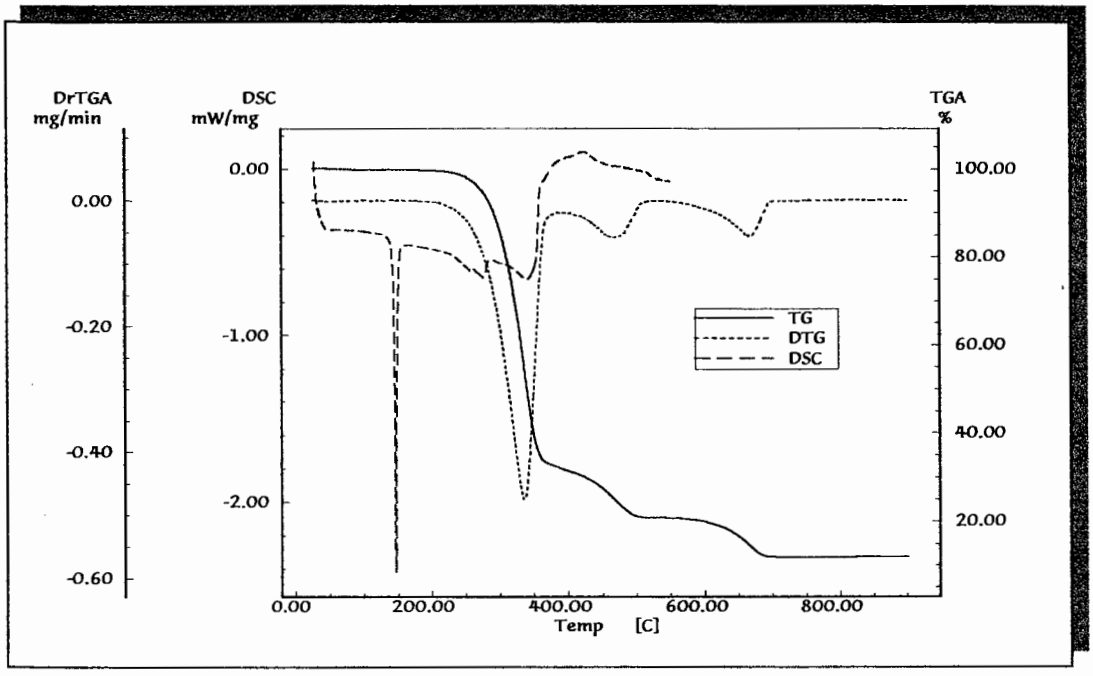

Figura IV.103 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF17, pertencente ao grupo B.

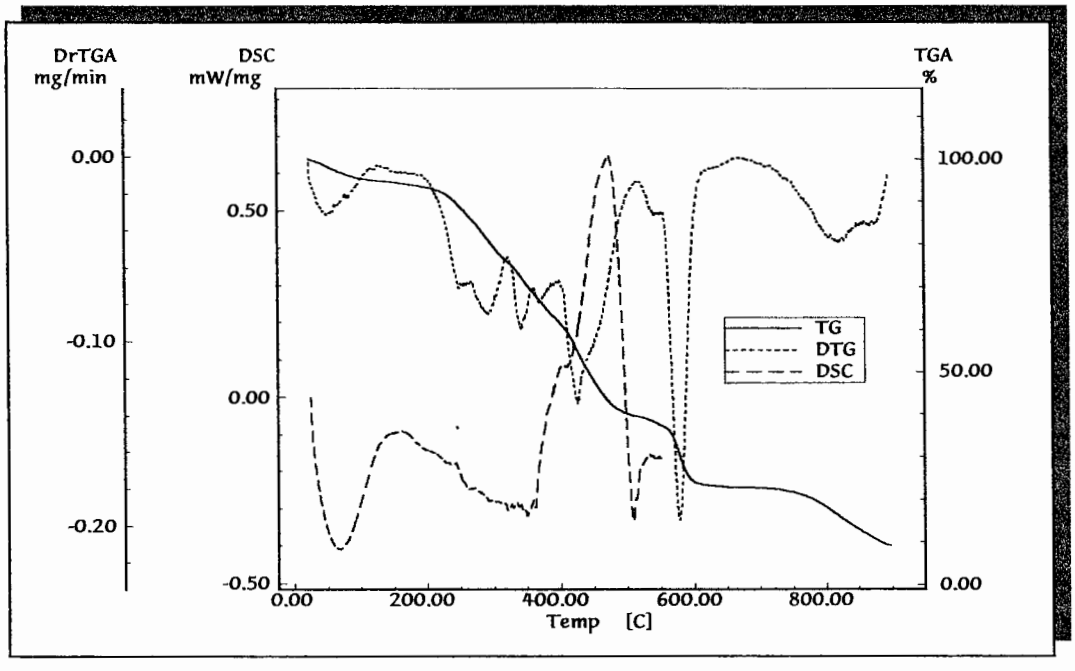

Figura IV.104 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BF17, pertencente ao grupo B.

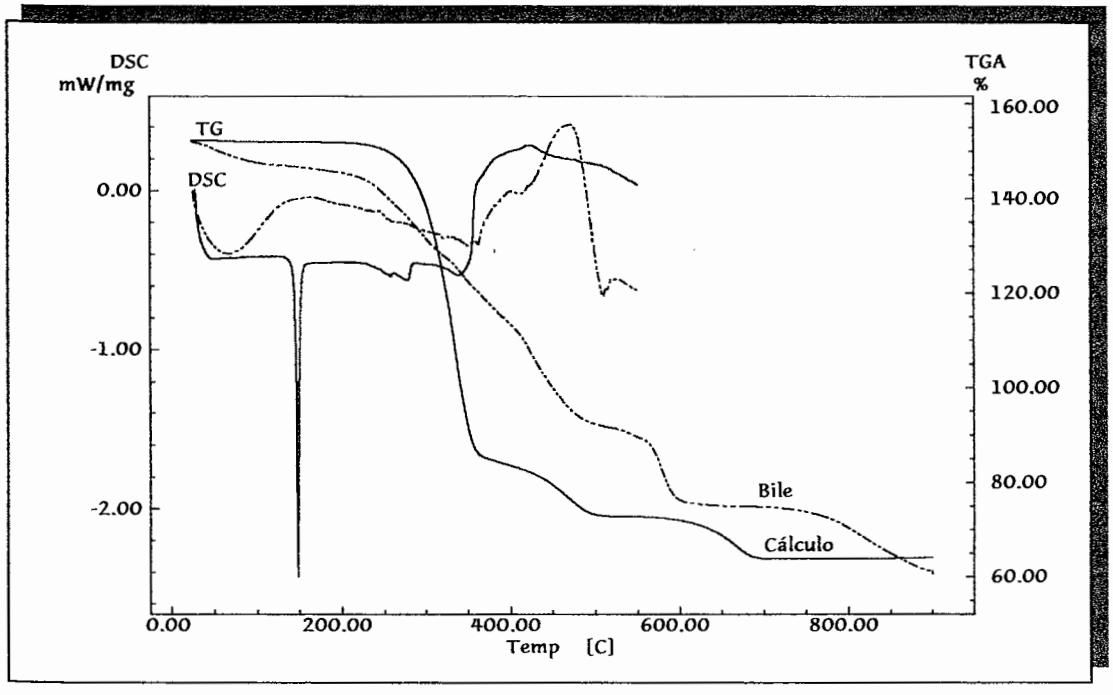

Figura IV.105 - Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SF17 e bile BF17, pertencentes ao grupo B.

IV.3.2.3. GRUPO C

As curvas TG/DTG das amostras de cálculos biliares pertencentes ao grupo C, especificamente para a amostra SM58, evidenciam uma etapa de perda de massa desde a temperatura ambiente até 180°C, caracterizando a libertação de água adsorvida e decomposição térmica em duas etapas bem definidas. A segunda etapa, de perda de massa com variação de 65,23%, ocorre rapidamente entre 180 e 374°C e corresponde à decomposição térmica com quebra de ligação e queima de matéria orgânica com conseqüente carbonização. Em seguida, ocorre uma perda de massa mais lenta até cerca de 650°C, com variação em torno de 33,98% e correspondente à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior. Nenhum outro evento acima de 650°C pOde ser observado (Tabela IV.15).

As curvas DSC dessas amostras de cálculos biliares evidenciam quatro eventos, cujos três primeiros são picos endotérmicos e o último é exotérmico. O

primeiro evento ocorre na faixa de temperatura de 35 a 54°C, característico de uma transição cristalina que, no caso da amostra SM58, está sobreposto com o evento de libertação de H_2O. O segundo evento ocorre entre 133 e 161°C com temperatura onset de 144,6°C e $\Delta H_s^!$ de 46,7 J/g (entalpia de fusão), o qual caracteriza o processo de fusão e é indicativo da presença de colesterol. Isto é confirmado na comparação com as curvas TG/DTG, onde se verifica a mesma ocorrência numa faixa de temperatura em que não se observa perda de massa. O terceiro evento é caracterizado por um pico no sentido endotérmico que ocorre na faixa de 183 a 326°C, seguido de um pico exotérmico formado entre 304 e 550°C que caracteriza a decomposição térmica desse material (Figura IV.118).

A Figura IV.118, mostra a sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SM58, representativa desse grupo. Ao compara-lo com os perfis das curvas TG/DTG/DSC do padrão de colesterol, observou-se uma certa similaridade entre esses dois materiais, bem como, entre o valor da temperatura e da entalpia de fusão, característica do mesmo. No entanto, seus teores de perda de massa foram bastante diferenciados (Tabela IV.14, IV.16 e Figura IV.118).

Com relação às amostras de bile, observou-se que os perfis das curvas TG/DSC foram bastante complexos e distintos das amostras de cálculos biliares, pertencente ao mesmo paciente, impossibilitando sua interpretação (Figura IV.120). Ao comparar os perfis das curvas TG da amostra de bile BM58 (Figura IV.119) com o padrão dos sais biliares (Figura IV.51), evidenciou-se uma etapa de perda de massa entre 700 e 900°C, que caracterizava a presença de sais biliares nessa amostra, confirmando a identificação do mesmo realizada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. As Figuras IV.121 a IV.124, que mostram as sobreposições das curvas TG/DTG/DSC de todas as amostras de cálculos biliares e bile, pertencentes a esse grupo, estão contidas no Apêndice.

Com base em toda caracterização termoanalítica e físico-química, vista anteriormente e comparando com o resultados obtidos dos padrões, pode-se dizer que todas as amostras pertencentes a esse grupo apresentam cálculos biliares rico em colesterol.

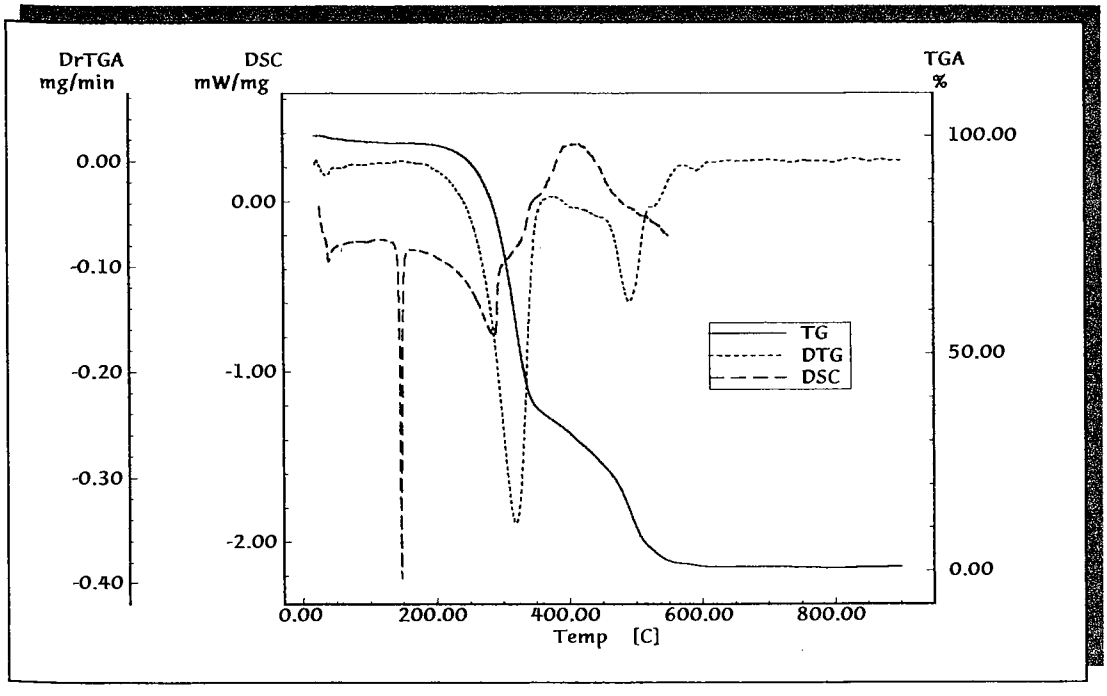

Figura IV.118 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC das amostras de cálculo biliar SM58, pertencente ao grupo C.

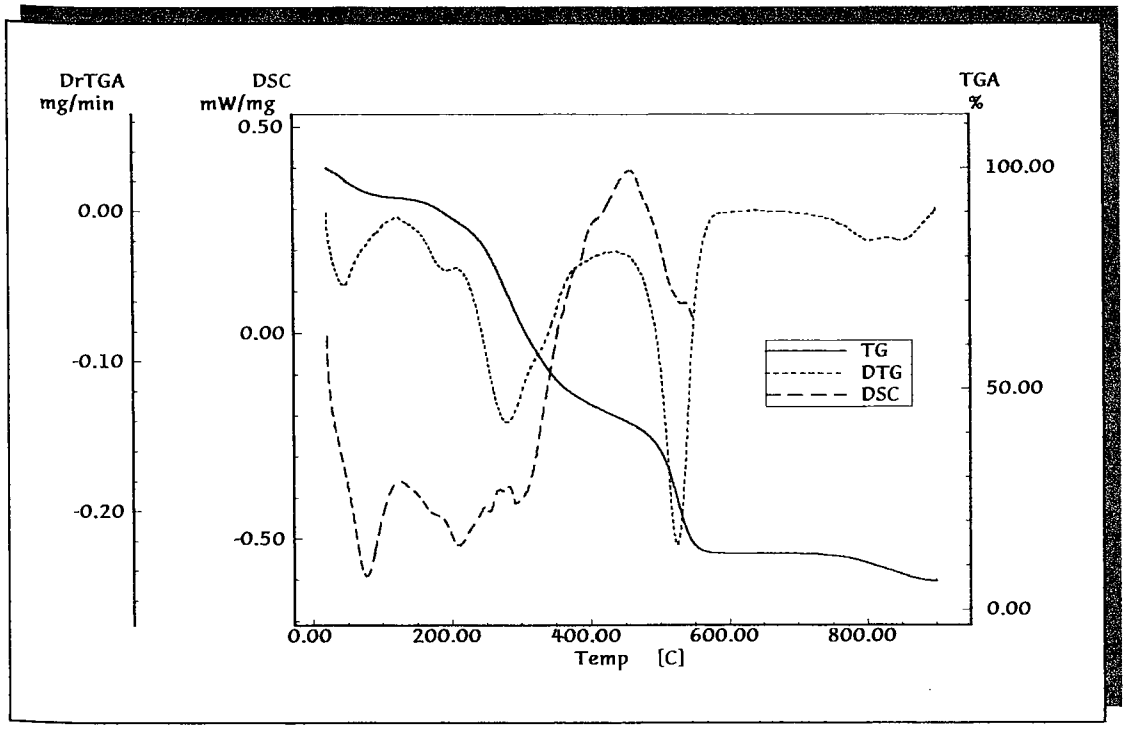

Figura IV.119 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BM58, pertencente ao grupo C.

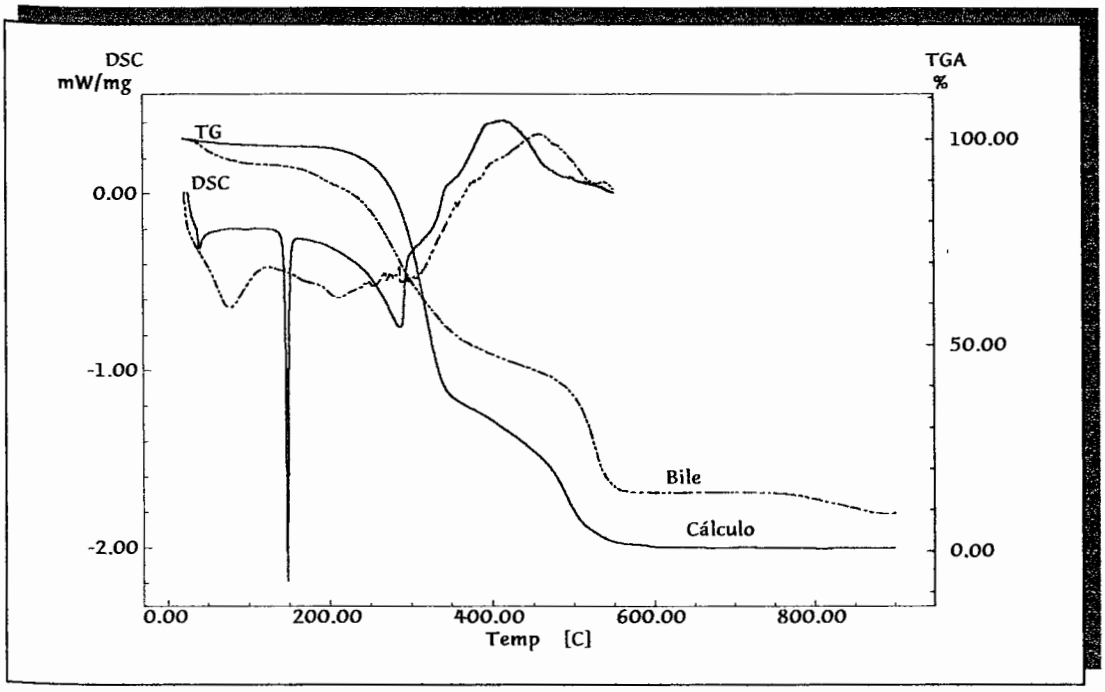

Figura IV.120 - Sobreposição das curvas TG/DSC das amostras de cálculo biliar SM58 e bile BM58, pertencentes ao grupo C.

IV.3.2.4. GRUPOS D, E, F e G

As curvas TG/DTG das amostras de cálculos biliares pertencentes aos grupos: D, E, F e G, apresentam perfis e teores de perda de massa, bastante distintos entre si e em relação às demais amostras e a todos os padrões caracterizados, principalmente, o colesterol (Tabelas IV.14 e IV.15) (Figuras IV.125, IV.130, IV.133 e IV.138).

Em todos os casos o processo de decomposição térmica inicia-se desde a temperatura ambiente, ou seja, entre 21 e 30°C, e ocorre de forma lenta e consecutiva. A distinção das amostras de cálculos biliares, pertencentes aos grupos D, E, F e G, foi realizada observando-se o número de eventos térmicos indicados a partir da curva DTG e a diferença no percentual do produto final obtido, que corresponde ao teor de material inorgânico presente na amostra e ainda às temperaturas indicativas de sua estabilização (Tabelas IV.15).

Especificamente, para a amostra BM44 pode-se estimar, pela última etapa de perda de massa, que o teor de $CaCO_3$ na amostra é aproximadamente 4%.

Ao comparar os perfis das curvas TG/DTG das amostras de biles pertencentes a esses grupos (Figuras IV.126, IV.131, IV.134 e IV.141) com aqueles do padrão dos sais biliares (Figura IV.51), evidenciou-se uma etapa de perda de massa entre 700 e 900°C, que caracteriza a presença de sais biliares nessas amostras, confirmando a identificação desses conforme indicado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. As Figuras IV.128 e IV.129 (GRUPO D); IV.136 e IV.137 (GRUPO F), que mostram as sobreposições das curvas TG/DTG e DSC de todas as amostras de cálculos biliares e bile, pertencentes a esses grupos, estão contidas no Apêndice.

As curvas DSC das amostras dos cálculos biliares e biles pertencentes aos grupos D, E, F e G apresentaram perfis e variações bastante complexos e distintos, impossibilitando sua interpretação (Figuras IV.127, IV.132, IV.135 e IV.140). De maneira geral, pode-se observar uma endoterma da temperatura ambiente até aproximadamente 200°C, que pode estar associada ao processo de desidratação das amostras, e uma exoterma acima de 300°C devido à decomposição térmica, relativamente, rápida de matéria orgânica.

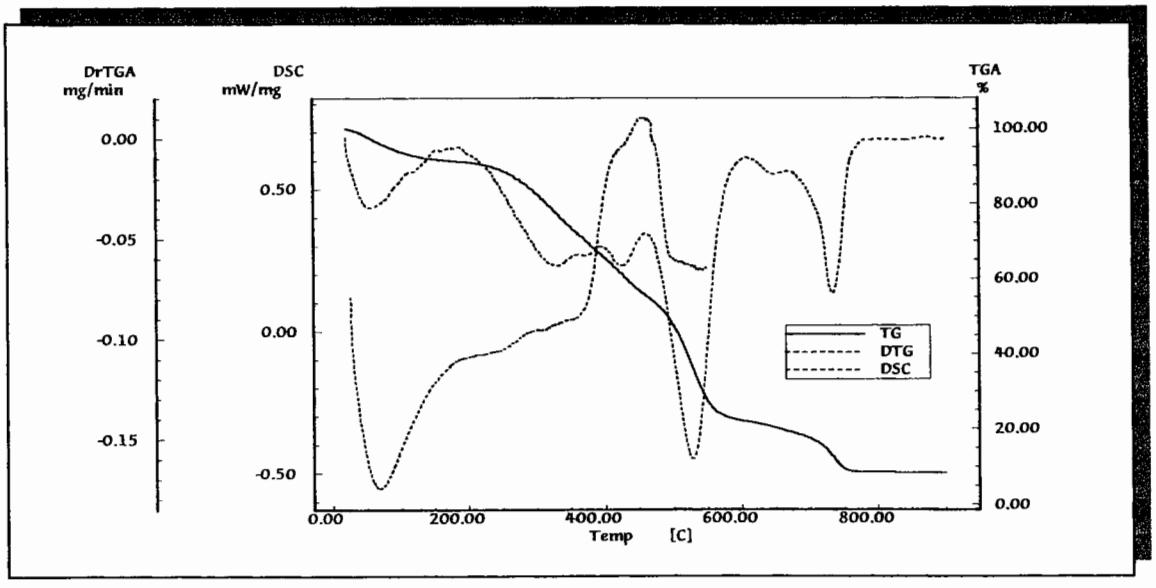

Figura IV.125 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SM31, pertencente ao grupo D.

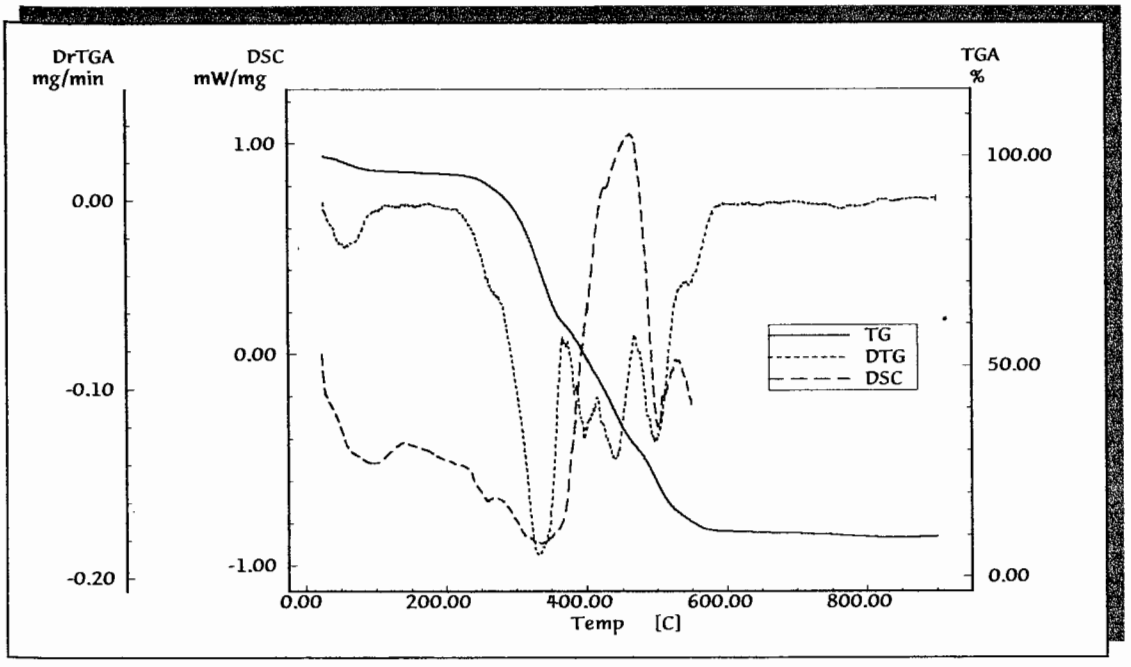

Figura IV.126 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BM31, pertencente ao grupo D.

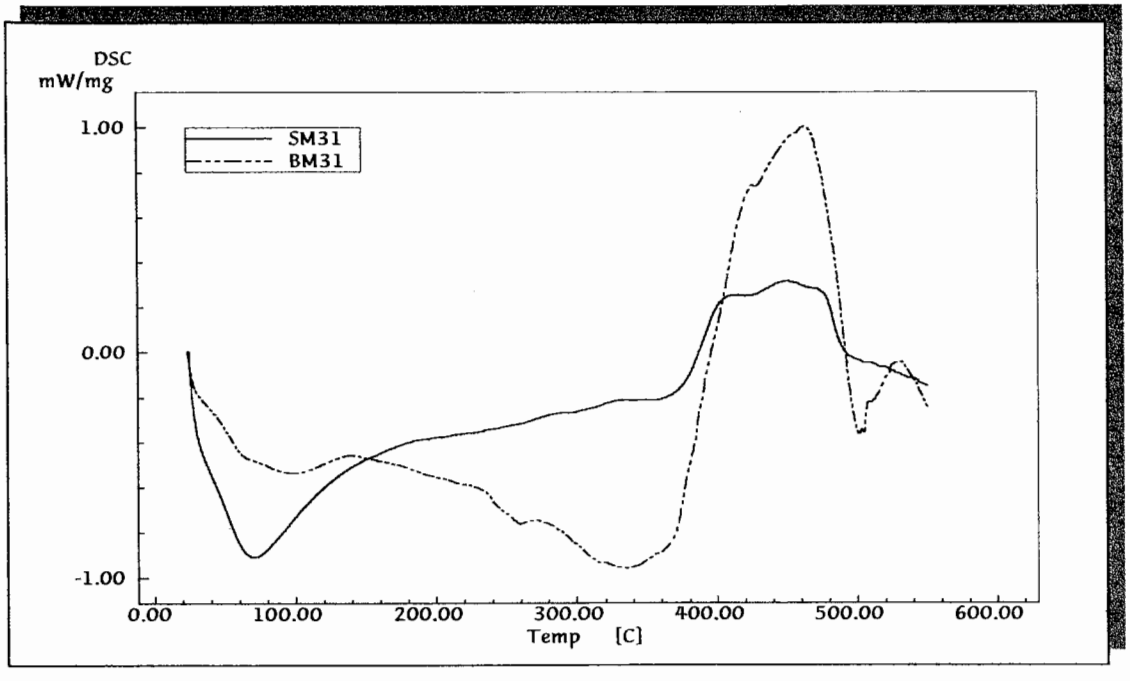

Figura IV.127 - Sobreposição das curvas DSC das amostras de cálculo biliar SM31 e bile BM31, pertencentes ao grupo D.

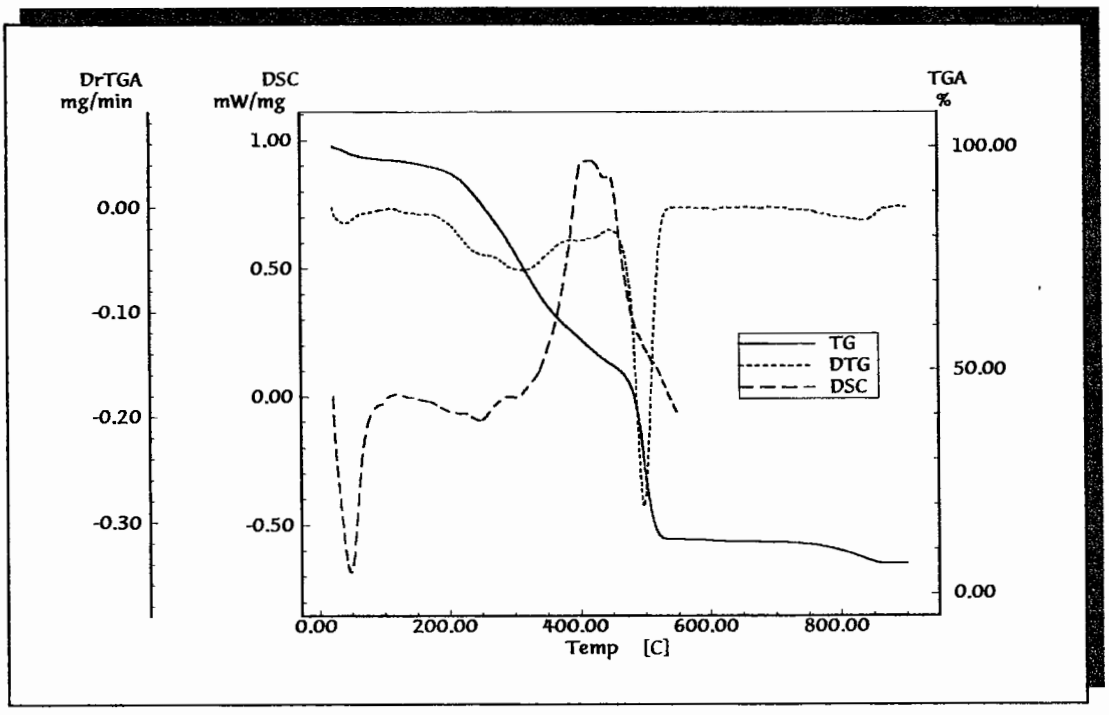

Figura IV.130 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC das amostras de cálculo biliar SF54, pertencente ao grupo E.

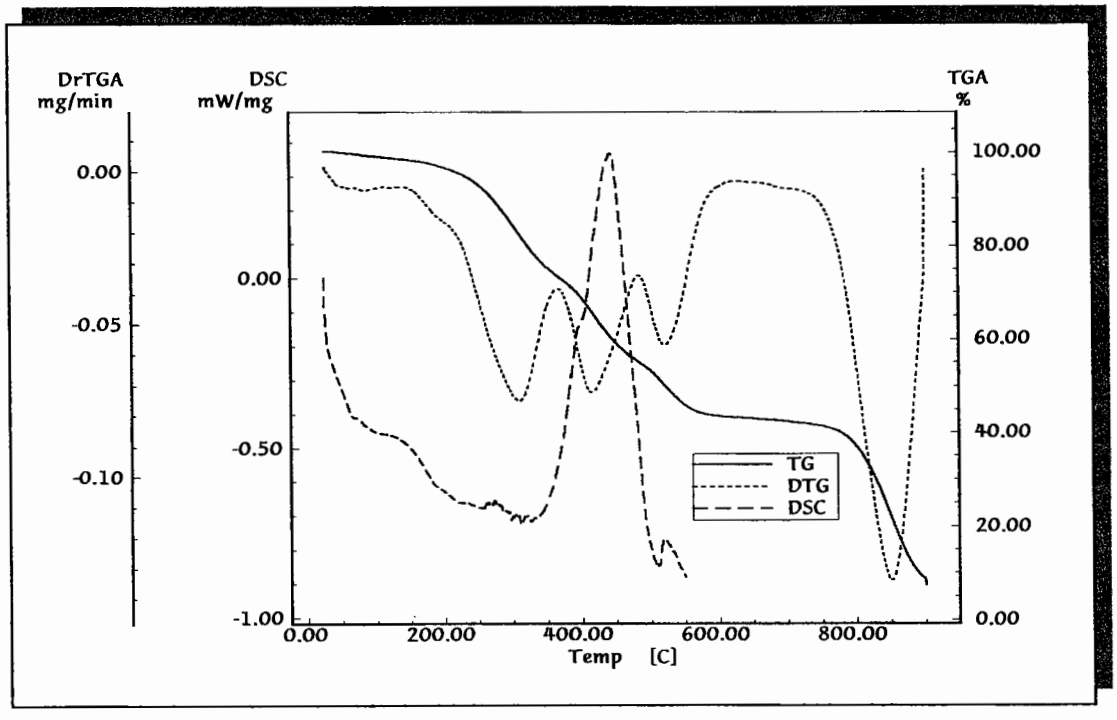

Figura IV.131 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile SF54, pertencente ao grupo E.

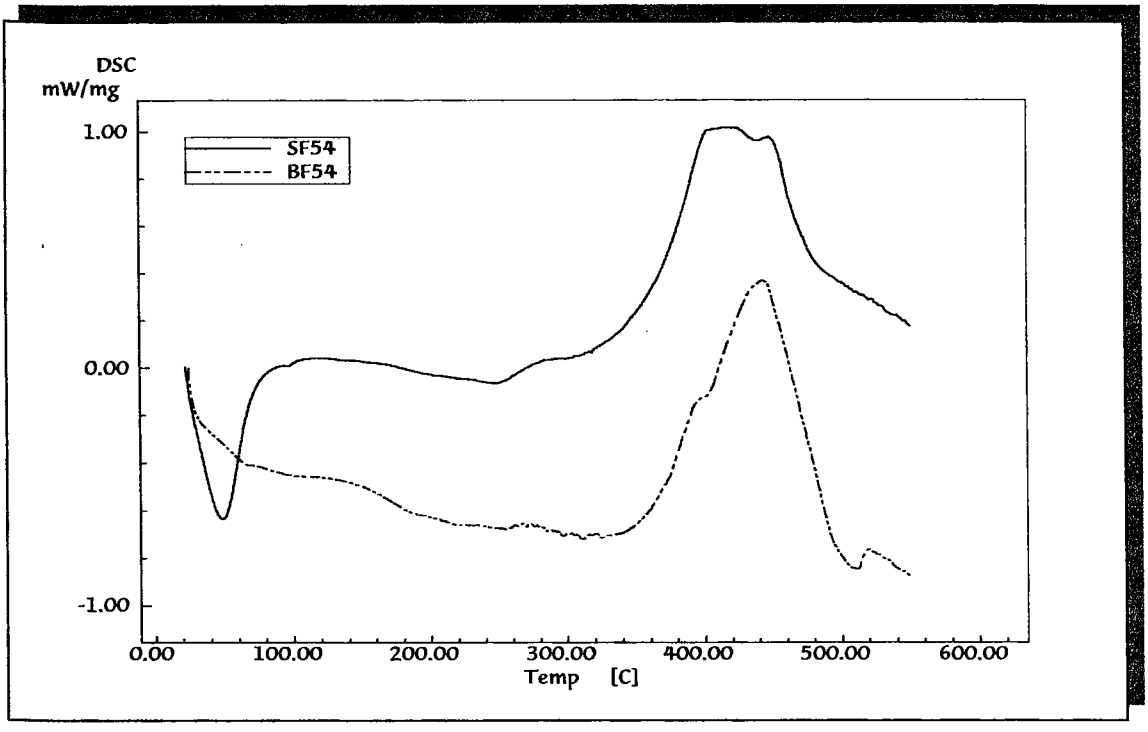

Figura IV.132 - Sobreposição das curvas DSC das amostras de cálculo biliar SF54 e bile BF54, pertencentes ao grupo E.

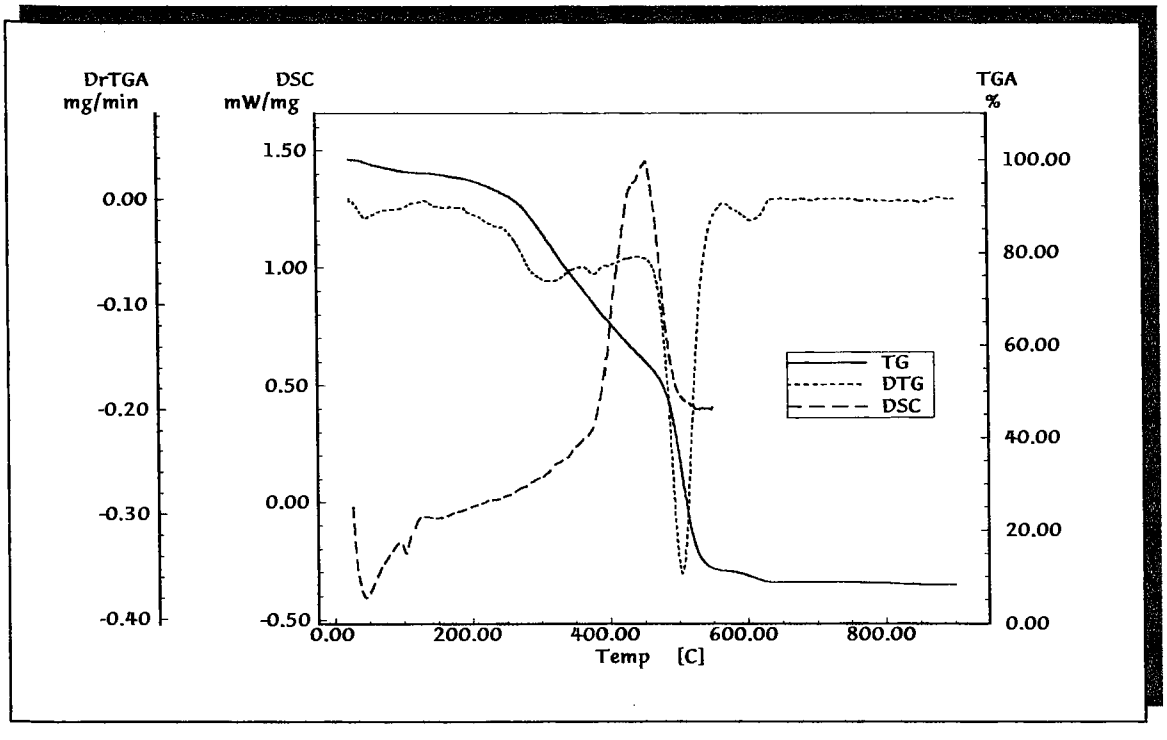

Figura IV.133 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF47, pertencente ao grupo F.

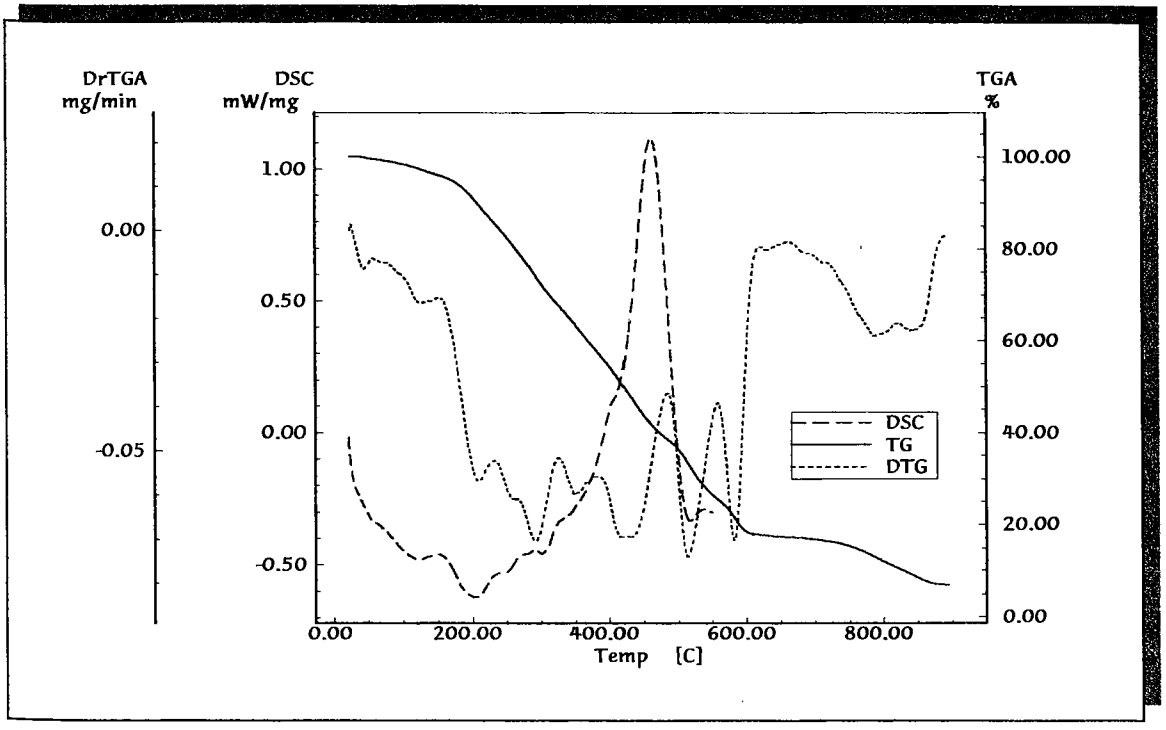

Figura IV.134 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile SF47, pertencente ao grupo F.

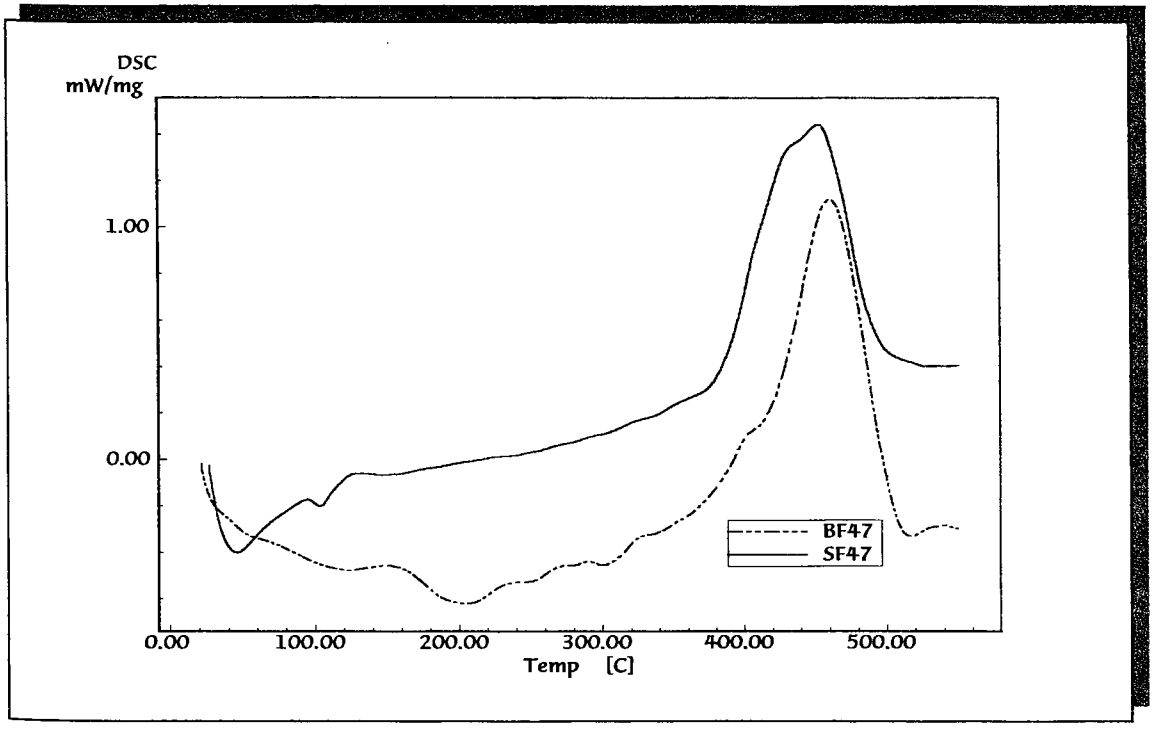

Figura IV.135 - Sobreposição das curvas DSC das amostras de cálculo biliar SF47 e bile BF47, pertencentes ao grupo F.

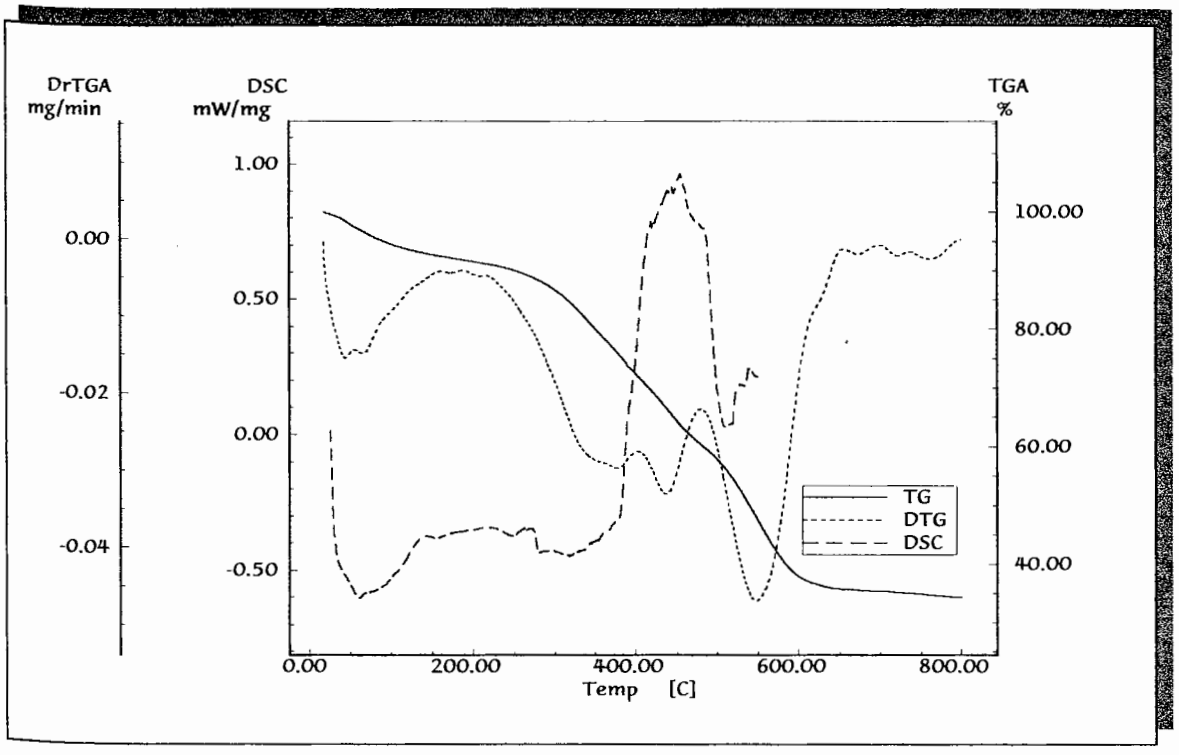

Figura IV.138 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SM44, pertencente ao grupo G.

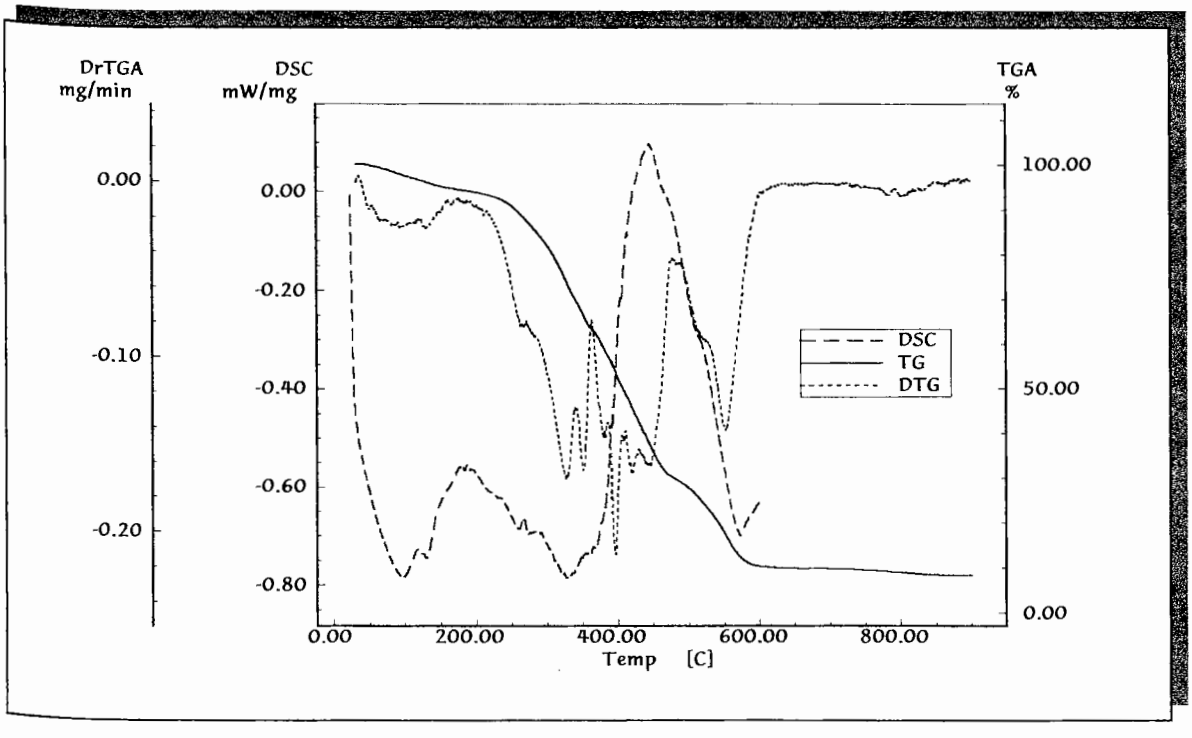

Figura IV.139 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BM44, pertencente ao grupo G.

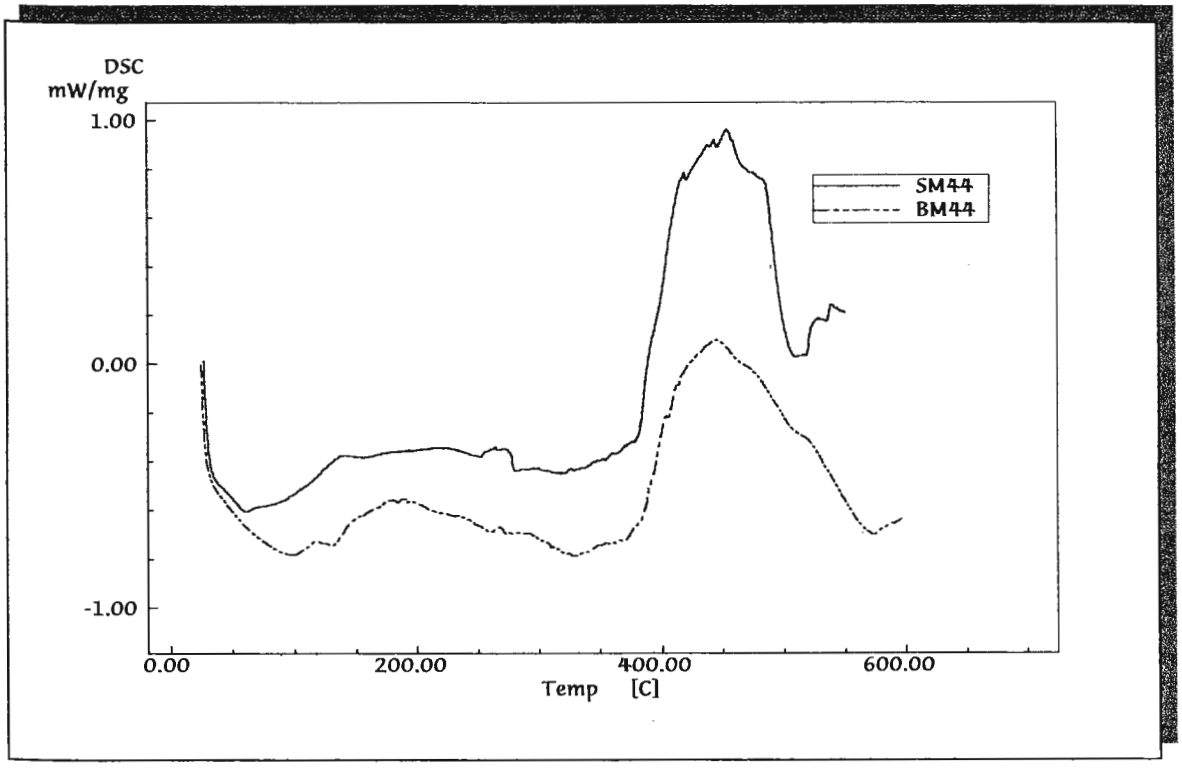

Figura IV.140 - Sobreposição das curvas DSC das amostras de cálculo biliar SM44 e bile BM44, pertencentes ao grupo G.

IV.3.2.5. GRUPO H

A amostra SF15 é um tipo de cálculo biliar considerado atípico, devido ao alto teor de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) identificado na mesma.

Os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio, obtidos por análise elementar (Tabela IV.2) sugerem que este tipo de cálculo biliar não tem origem do colesterol. O espectro de absorção na região do infravermelho confirma a presença de carbonato através das bandas características dessa espécie, Figura IV.31. O difratograma de raios X indica a existência de $CaCO_3$ na forma de calcita e vaterita, Figura IV.41.

As curvas TG/DTG evidenciam quatro etapas de perda de massa, nas quais as três primeiras, que ocorrem entre 25 e 500°C, contribuem para uma variação de massa de 15,55%. A quarta etapa, que ocorre entre 550 e 750°C sob atmosfera de ar, é característica da decomposição térmica do $CaCO_3$ e

corresponde à variação de massa de 35,83% devido à descarbonatação, Tabela IV.15 e Figura IV.141. Num segundo experimento, sob atmosfera dinâmica da mistura ar/CO_2, a amostra foi aquecida até 1200°C e em seguida resfriada até 500°C, Figura IV.142. Neste caso, o evento da descarbonatação durante o aquecimento é deslocado para temperaturas maiores e ocorre entre 913 e 1007°C. No resfriamento, observa-se a recarbonatação entre 940 e 640°C. Estes resultados confirmam a presença do $CaCO_3$ e permitem pelo cálculo estequiométrico, utilizando a variação de massa na descarbonatação, determinar que o teor deste material no cálculo biliar foi de 81,64% e o de cálcio aproximadamente 32%. A Figura IV.143 mostra a sobreposição das curvas TG da amostra SF15 e dos padrões de colesterol, bilirrubinato de cálcio e $CaCO_3$, fornecendo mais informações sobre a composição desse cálculo biliar, considerado como um caso atípico. Uma avaliação mais cuidadosa e detalhada, correlacionando os resultados obtidos desde as diversas técnicas, permitiu inferir sobre sua composição.

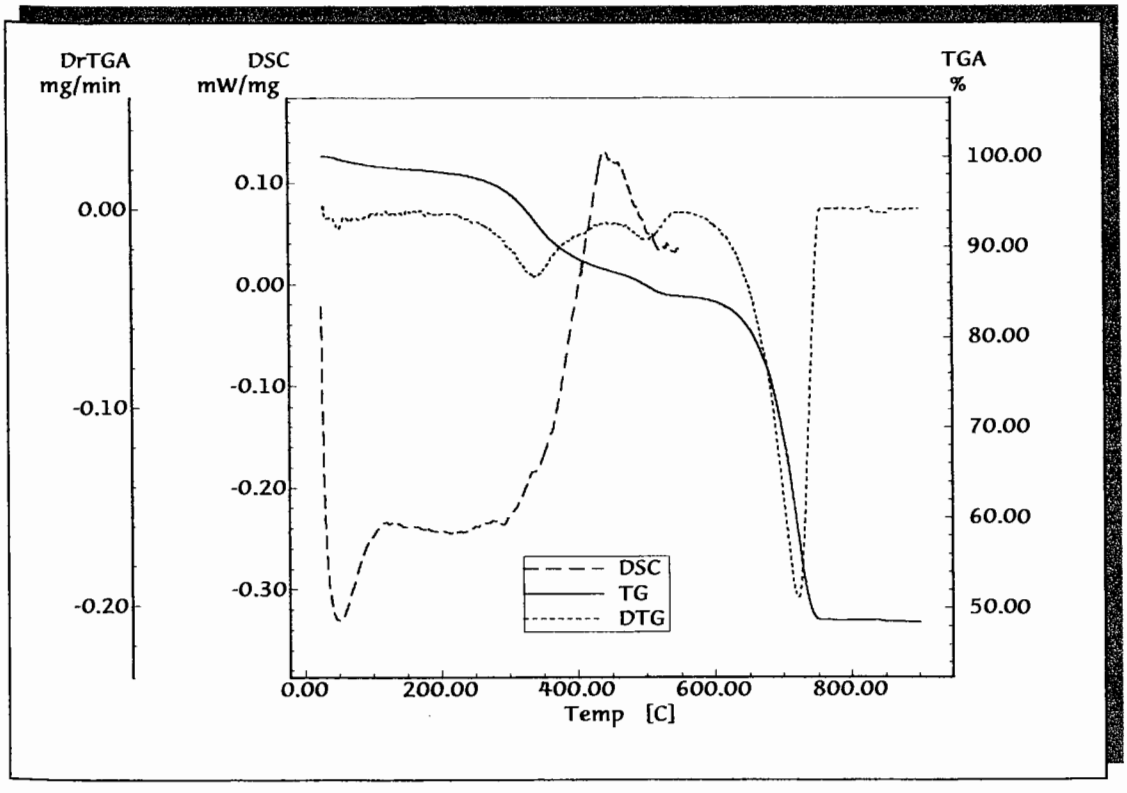

Figura IV.141 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de cálculo biliar SF15, pertencente ao grupo H.

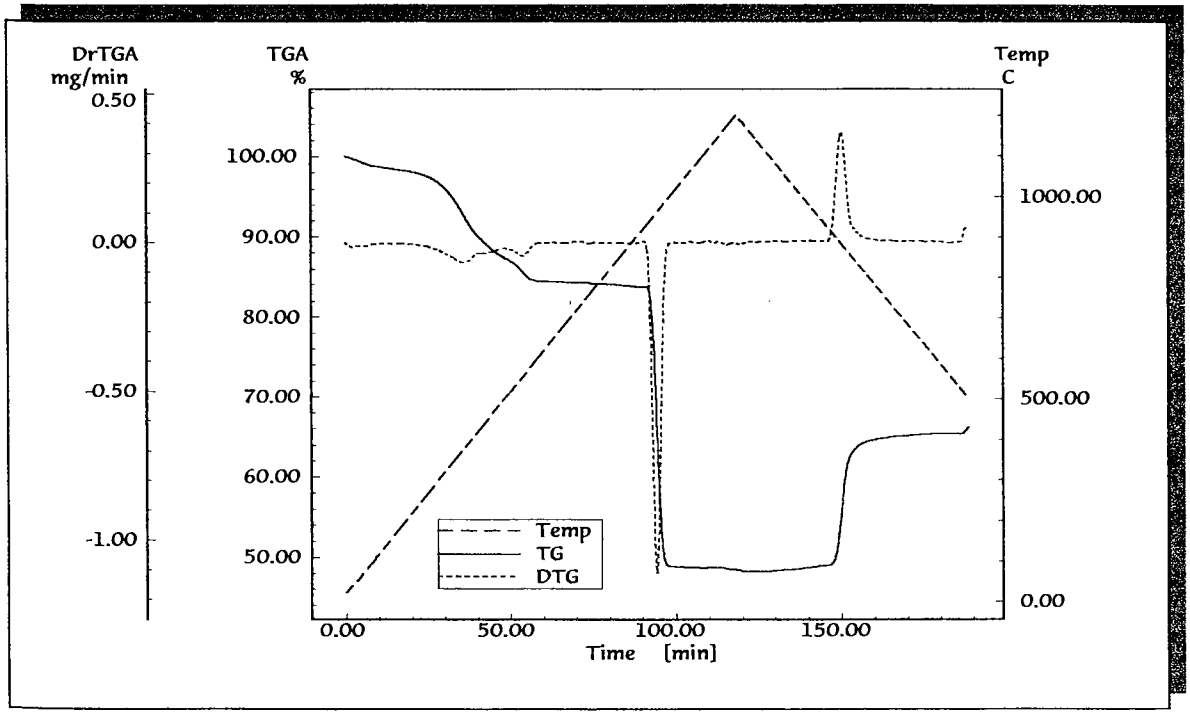

Figura IV.142 - Curvas TG/DTG da amostra SF15, obtidas sob atmosfera mista ar+CO_2, submetida a uma programaçao de aquecimento a 10°C.min^{-1} da temperatura ambiente até 1200°C, e uma de resfriamento a -10°C.min^{-1} até 500°C.

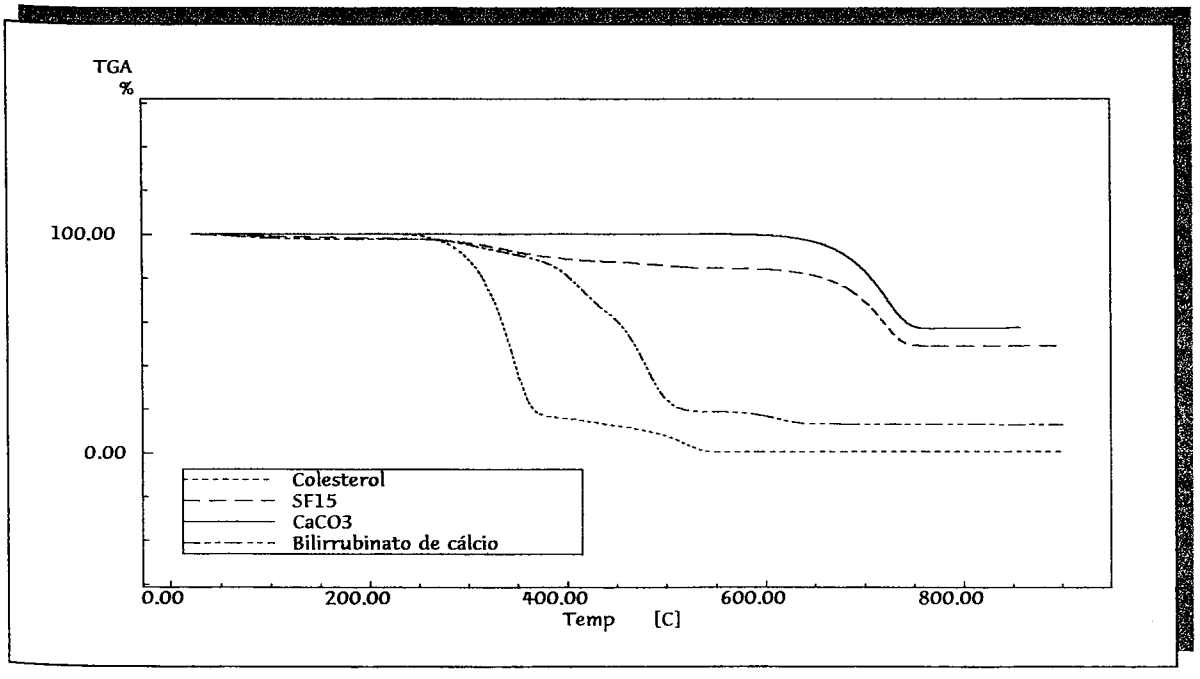

Figura IV.143 - Sobreposição das curvas TG da amostra SF15, do padrão de carbonato de cálcio e do padrão de colesterol.

Ao comparar os perfis das curvas TG/DTG da amostra de bile BF15 pertencente a esse grupo (Figuras IV.144) com aqueles do padrão dos sais biliares (Figura IV.51), evidenciou-se uma etapa de perda de massa entre 700 e 900°C, que caracteriza a presença de sais biliares na amostra, confirmando a identificação daqueles sais conforme indicado por espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

As curvas DSC das amostras de cálculo biliar e bile, SF15 e BF15, respectivamente, apresentaram perfis bastante complexos e distintos, impossibilitando sua interpretação (Figuras IV.145), porém pode-se concluir que o evento endotérmico observado em ambas as amostras, desde a temperatura ambiente até aproximadamente 150°C, corresponde ao processo de desidratação.

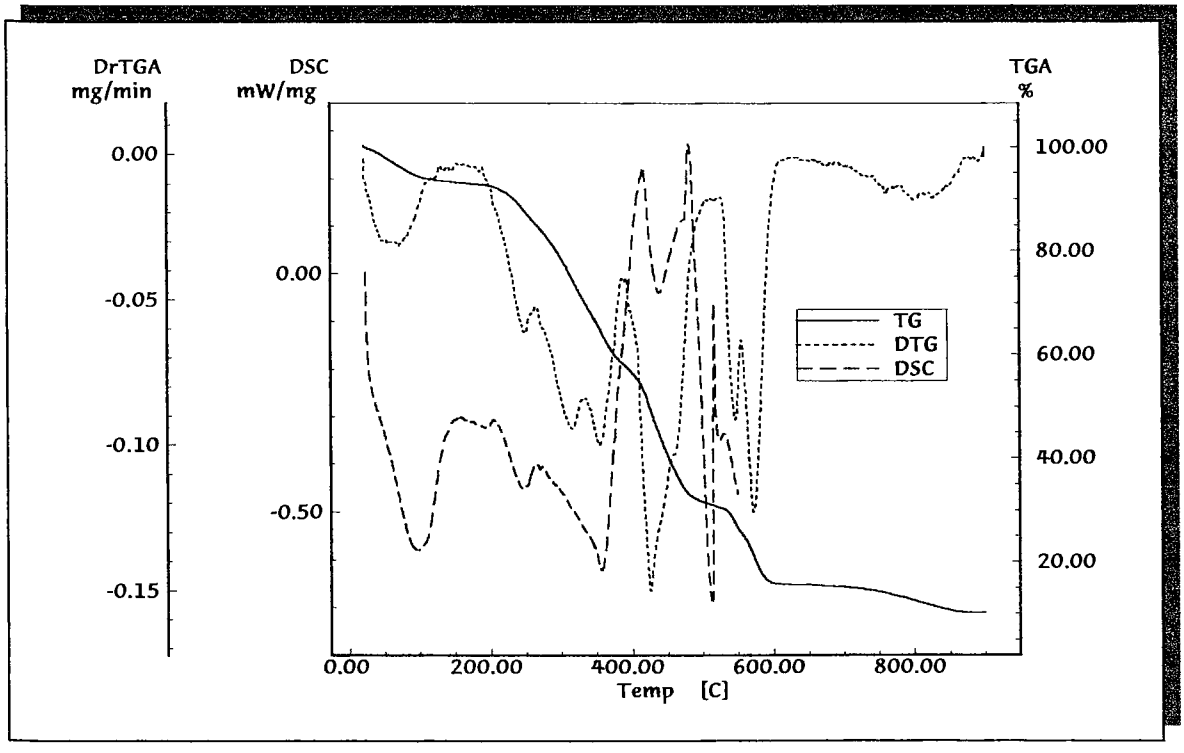

Figura IV.144 - Sobreposição das curvas TG/DTG/DSC da amostra de bile BF15, pertencente ao grupo H.

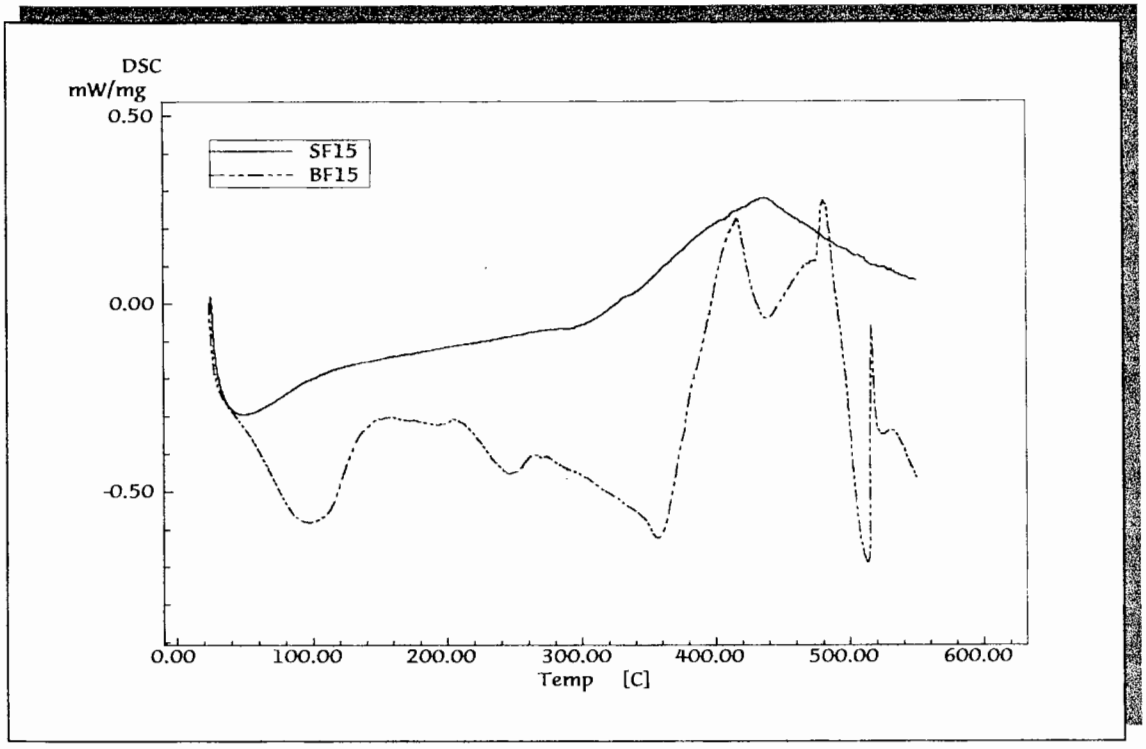

Figura IV.145 - Sobreposição das curvas DSC das amostras de cálculo biliar SF15 e bile BF15, pertencentes ao grupo H.

É interessante notar que a partir dos dados de TG/DTG, associados com as informações oriundas da análise elementar e DRX, foi possível estimar os teores dos possíveis constituintes da amostra de cálculo biliar SF15 pertencente ao grupo H.

A partir das curvas TG/DTG, observou-se uma perda de massa de 1,74% até a temperatura de aproximadamente 200°C que corresponde à libertação de H_2O. O segundo e terceiro eventos de perdas de massas entre 200 e 550°C correspondem à decomposição térmica do bilirrubinato de cálcio ($C_{33}H_{44}N_4CaO_6$) com a formação de CaO. Então estequiometricamente, com base na percentagem de voláteis (13,90%), pode-se estimar o teor de bilirrubinato da cálcio na amostra, isto é:

$C_{33}H_{44}N_4CaO_6$	→	CaO	+	Voláteis
622,71 g.mol^{-1}		56,08 g.mol^{-1}		566,65 g.mol^{-1}
x_2		x_1		13,90%

Então, tem-se: x_1 = 1,38%, correspondente à quantidade de CaO formado e x_2 = 15,27%, que corresponde à percentagem de bilirrubinato de cálcio no material de partida.

O quarto evento de perda de massa, entre 550°C e 800°C, corresponde à decomposição térmica do $CaCO_3$, com a liberação de 35,90% de CO_2, isto é:

$CaCO_3$	→	CaO	+	CO_2
100,09 g.mol^{-1}		56,08 g.mol^{-1}		44,01 g.mol^{-1}
x_2		x_1		35,90%

Então, tem-se: x_1 = 45,74%, correspondente à quantidade de CaO formado e x_2 = 81,64%%, que corresponde à percentagem de $CaCO_3$ no material de partida.

A percentagem do produto final na temperatura de 900°C, corresponde a 48,47%. Somando-se o teor de CaO derivado do bilirrubinato de cálcio com aquele proveniente da decomposição térmica do $CaCO_3$ encontrou-se o valor de 47,12% (45,74 + 1,38). Então, conclui-se que além do CaO no produto final, há ainda 1,35% de um outro material que é termoestável nesta temperatura.

Somando-se os teores de água + bilirrubinato de cálcio + carbonato de cálcio, encontrou-se o valor de 98,65%, que corresponde à diferença de 1,35% em relação ao material de partida. Isso confirma que, realmente, há um outro componente que faz parte da composição química dessa amostra. Correlacionando esses dados com o de DRX conclui-se que esse componente deve

ser o fosfato de cálcio ($Ca_2P_6O_{17}$) termoestável até a temperatura de 900°C e que foi identificado no difratograma de raios X da amostra SF15.

Uma outra evidência que confirma a presença desses componentes é a comparação dos teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio, obtidos por análise elementar (A.E). Calculando-se a percentagem desses elementos a partir da composição estimada por TG/DTG, têm-se os seguintes teores: carbono ($\%C_{total}$= 19,50), nitorgênio ($\%N_{total}$= 1,37) e hidrogênio ($\%H_{total}$= 1,28), os quais aproximam-se dos valores obtidos pela análise elementar, Tabela IV.2.

Considerações Finais

CAPÍTULO V

- Conclusões Gerais

V. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho pelo estudo da caracterização química e termoanalítica dos cálculos biliares e da bile humana foi possível concluir que:

1. Em relação às classificações dos cálculos biliares relatadas na literatura, as técnicas, tanto analíticas como termoanalíticas, proporcionaram um refinamento para a identificação das espécies químicas neles presentes.
2. No universo estudado de 40 amostras de cálculos biliares, considerada a sua composição química, podem-se classificar oito grupos distintos (A, B, C, D, E, F, G e H).
3. Na sua mais ampla extensão, os resultados analíticos e termoanalíticos obtidos correlacionaram-se, facilitando assim a sua interpretação.
4. Nas amostras dos cálculos biliares a Termogravimetria e Termogravimetria derivada (TG/DTG) possibilitou a determinação do teor de materiais inorgânicos presentes, auxiliou na identificação de sua composição química, bem como, na classificação dos oito grupos.
5. O desempenho da técnica da calorimetria exploratória diferencial (DSC), revelou, pelos eventos físicos (como por exemplo, o ponto de fusão), se um determinado cálculo biliar apresentava ou não colesterol na sua composição e, ainda, se era monohidratado (presença de uma molécula de água) e/ou anidro (ausência de água).
6. A correlação dos resultados obtidos pelas técnicas de Análise elementar (A.E), pela Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), pela Difração de raios X (DRX), e pela Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG) e Calorimétria exploratória diferencial (DSC), ressaltou para ambas as amostras de cálculos biliares e bile, a diferença da composição química no momento da colecistectomia.
7. A correlação dos resultados obtidos por Espectroscopia de absorção na região do infravermelho e pela Termogravimetria /Termogravimetria derivada (TG/DTG), evidenciou que as amostras de bile, pertencentes aos grupos A, B, C, D,

E e G, apresentavam composição química semelhante, à exceção do grupo F que, segundo o espectro de absorção na região do infravermelho, não revelava bandas características de éster metílico de ácido cólico, componente identificado nas amostras dos outros grupos.

8. A amostra SF15, pertencente ao grupo H, merece destaque por apresentar um teor de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) de 81%, muito diferente daquele relatado na literatura para os cálculos pigmentares pretos que, no máximo, apresentariam 6% desse composto. Outrossim, a correlação entre as técnicas TG/DTG, FTIR e AE sugere que, além do $CaCO_3$ há, na composição desse cálculo biliar, considerado atípico pelo alto valor de $CaCO_3$, o colesterol, a bilirrubina e/ou bilirrubinato de cálcio.

9. Os ensaios de difração de raios X, foram sugestivos por confirmarem a presença de materiais inorgânicos com diferentes estruturas e compostos orgânicos, tais como, colesterol e bilirrubina na composição dos cálculos biliares. Mas, não o foram para a caracterização das amostras de bile, devido à alta higroscopicidade desse material, após submissão à liofilização.

10. Quanto ao estudo termoanalítico, diante do comportamento térmico e caracterização química dos diferentes grupos, pode-se inferir que o mecanismo de precipitação dos cálculos biliares também foi distinto.

Perspectivas Futuras

CAPÍTULO VI

- Sugestões para Estudos Posteriores

VI. SUGESTÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES

Com a elaboração dessa nova classificação para os cálculos biliares, originaram-se novas idéias e possibilidades de ampliar o universo de estudos desses materiais. À vista disso, seguem algumas sugestões que deverão, futuramente, ser executadas, visando solucionar o desequilíbrio químico que ocorre provocado por uma disfunção metabólica dos órgãos que fazem parte do processo de secreção e eliminação da bile.

✓ Primeiramente, seria de grande valia propor o estudo comparativo da composição química e termoanalítica de bile não litiásica e litiásica, pois assim ter-se-ia condições de avaliar a existência ou não da composição química diferença de uma vesícula considerada "doente" e uma "sadia".

✓O estudo comparativo entre a composição química e termoanalítica de cálculos biliares e bile de animais [como por exemplo, mamíferos das famílias dos bovídeos (boi e vaca) com os do homem, pode possibilitar uma avaliação mais aprofundada do mecanismo de reação que origina a precipitação desses cálculos biliares.

✓O estudo da determinação de metais pesados, a nível de traços, em amostras de cálculos biliares e bile e a correlação entre os aspectos químicos e clínicos, poderá auxiliar no entendimento do mecanismo de formação desses cálculos biliares.

✓A identificação dos produtos voláteis provenientes do processo de decomposição térmica dos cálculos biliares e bile humana, pode permitir avaliar a influência de compostos ingeridos ou inalados pelos pacientes, os quais, talvez, possam provocar um processo tóxico acelerando a precipitação e, consequentemente, a formação dos cálculos biliares.

✓Certamente, a avaliação estatística da composição química dos cálculos biliares e bile de pacientes de diferentes regiões geográficas, contribuirá bastante na explicação do mecanismo de formação desse material.

✓Estudo comparativo da composição química dos tipos de cálculos de acordo com sua localização na árvore biliar, ou seja, cálculos que precipitam na parede da vesícula, os migrados da vesícula biliar (estase/infecção) e os primários dos ductos biliares, intra-hepáticos ou extra-hepáticos, e a correlação dos resultados obtidos com os dados clínicos dos pacientes, poderão trazer novas informações acerca do seu mecanismo de formação.

Todas essas propostas, uma vez executadas, poderão possibilitar o conhecimento do porquê, onde e como ocorre esse desequilíbrio químico no processo biliar, oferecendo subsídios para a elaboração de uma metodologia preventiva ou a síntese de um fármaco que possa evitar a precipitação e formação dessas concreções, na árvore biliar ou na vesícula.

CAPÍTULO VII

Referências Bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMIRAND, W.H., SMALL, D. M. The physiochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. J. Clin. Ynvest., v. 47, p.1043, 1968.

ALEXANDER, K.S., DOLLIMORE, D., DUNN, J.G., GAO, X., PATEL, D. The determination of cholesterol, calcium carbonate and calcium oxalate in gallstone by thermogravimetry. Thermochim. Acta, v.215, p.171-181, 1993.

APSTEIN, M.D., CAREY, M.C. Biliary tract stones and associated diseases. In: STEIN, J.H., ed. Internal medicine, 4 ed. St. Louis: Mosby Yearbook, 1993.

ASCHOFF, L. Lectures on pathology. New York, 1924.

AZAROFF, L. V., BUERGER, M. J. The powder method in X-ray Crystallography. McGraw-Hill Book Company, USA, 1958, p. 342.

BEER, J.M., BILLS, P.M., LEWIS, D. Electron probe microanalysis in the study of gallstones. Gut, v.18, p.836-842, 1977.

BEER, J.M., BILLS, P.M., LEWIS, D. Microstruture of gallstones. Gastroenterology, v.76, p.548-555, 1979.

BEHAR, J., LEE, K.Y., THOMPSON, W.R., BRANCANI, P. Gallbladder contraction in patients with pigment and cholesterol stones. Gastroenterology, v.97, p.1479-1484, 1989.

BELLAMY, L.J. The Infra-red spectra of complex molecules. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. New York, 1975.

BILLS, P.M., LEWIS, D. A structural study of gallstones. Gut, v.16, p.630-637, 1975.

BONNETT, R., DAVIES, J.E., HURSTHOUSE, M.B. Structure of bilirubin. Nature, v.262, p.326-328, 1976.

BOCKUS, H. L. Gastroenterology. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1985. p.3499, 3454, 3500.

BROWN, M. E. Introduction to thermal analysis: techniques and applications. London: Chapman and Hall, 1988.

BUERGER, M. J. X-ray Crystallography. Londres: John Wiley and Sons. 1942. Apud: FORMOSO, M. L. L., TRESCASES, J. J., DUTRA, C. V., GOMES, C. B., 1984.

CAHALANE, M.J. ; CAREY, M.C.; NEUBRAND, M.W. Physical-chemical pathogenesis of pigment gallstones. Semin Liver Dis., v.8, p.317-328, 1988.

CAMMENGA, H. K., EPPLE, M. Basic principles of thermalanalytical techniques and their applications in preparative chemistry. Angew Chem. Int. Ed. Engl., v.34, n.11, p.1171-1187, 1995.

CAREY, M.C.; SMALL, D.M. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile relationship to gallstone formation and dissolution in man. J. Clin. Invest., v.61, p.998-1026, 1978.

CAREY, M.C. Formation of cholesterol gallstones: the new paradigms. In: PAUMGARTNER, G. , STIEHL, A., GEROK, W., eds. Trends in bile acid research. Dordrecht: Kluwer, 1988. p.259-281.

CAREY, M.C. Pathogenesis of gallstones. Recenti Prog. Med., v.83, p.379-391, 1992.

CAREY, M.C. Pathogenesis of gallstones. Am. J. Surg. v.165, p.410-419, 1993.

CETTA, F. The role of bacteria in pigment gallstone formation. Ann. Surg., v.213, p.315-326, 1991.

CHARSLEY, E. L., WARRINGTON, S. B. Thermal analysis: techniques and applications. Cambridge: Hartnolls, Boodmin, 1992.

CULLITY, B.D. Elements of x-ray diffraction. London: Addison-Wesley, p.514, 1967.

DOLLIMORE, D., LERDKANCHANAPORN, S. Thermal analysis. Analytical chemistry, v.70, n.12, p.27R-35R, 1998.

DUVAL, C. Inorganic thermogravimetric analysis. 2.ed. New York: Elsevier., 1963.

DOWLING, R.H. The enterohepatic circulation. Gastroenterology, v.62, p.122, 1972.

EDWARDS, J.D., ADAMS, W. D., HALPERT, B. Infrared spectrums of human gallstones. March, v.29, p. 236-238, 1958.

FEVERY, J., BLANCKAERT, N.B., LEROY, P., MICHIELS, R., HEIRWEGH, K.P.M. Analysis of bilirubins in biological fluids by extraction and thin-layer chromatography of the intact tetrapyrrols: application to bile of patients with Gilbert´s syndrome, hemolysis or cholelithiasis. Hepatology, v. 3, p.177-183, 1983.

FORMOSO, M. L. L., TRESCASES, J. J., DUTRA, C. V., GOMES, C. B. Técnicas analíticas instrumentais aplicadas à geologia. São Paulo: Edgard Blucher, 1984.

GIOLITO, I. Desenvolvimento, classificação e aplicações dos métodos termoanalíticos. Rev. Quím. Ind., v.663, p.12-20, 1988.

GIOLITO, I., IONASHIRO, M. A nomenclatura em análise térmica. Cerâmica, v.34, p.163-164, 1988.

GUINIER, A. Theorie et technique de la radio-cristallographie. Dunod-Paris, 1956, Apud: FORMOSO, M. L. L.; TRESCASES, J. J., DUTRA, C. V., GOMES, C. B., 1984.

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

HANAWALT, J.D., RINN, H.W. Identification of crystalline materials. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., v.8, p.244, 1936.

HANAWALT, J.D.; RINN, H.W., FREVEL, L.K. Chemical analysis by x-ray diffraction. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., v.10, p.457, 1938.

HO, K.J.; HSU, S.C., CHEN, J.S., HO, L.H.C. Human biliary β-glucuronidase: correlation of its activity with deconjugation of bilirubin in the bile. Eur J. Clin. Invest., v.65, p.1301-1308, 1986.

HOFMANN, A.F. Bile acid secretion, bile flow and biliary lipid secretion in humans. Hepatology, v.12, p.175-255, 1990.

HOLAN, K.R.; HOLZBACH, R.T.; HERMANN, R.E.; COOPERMAN, A.M., CLAFFEY, W.J. Nucleation Time: a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. Gastroenterology, v.77, p.611-677, 1979.

IONASHIRO, M. As técnicas termoanalíticas. In: Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 28, São Paulo, 1993. Resumos. São Paulo: ACIESP, 1993. n.88.

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

JANSEN, J. A. J., VAN DER MAAS, J. H., POSTHUMA DE BOER, A. Hyphenated On-the-Spot TG/FT-IR technique. Appl. Spectrosc., v.46, p.88, 1992.

KEATTCH, C. J., DOLLIMORE, D. An introduction to thermogravimetry, 2.ed. Great Britain: Heyden & Son, 1975.

KLUG, H., ALEXANDER, L. E. X-ray difraction procedures. John Wiley, 1954, Apud: FORMOSO, M. L. L., TRESCASES, J. J., DUTRA, C. V., GOMES, C. B., 1984.

LAMONT, J.T., CAREY, M.C. Cholesterol gallstone formation. 2. Pathobiology and pathomechanics. Prog. Liver Dis., v.10, p.165-191, 1992.

LAUE, M.V. Historical introdution. International tables for x-ray crystallography. Birmingham: Kynoch Press, 1952. v.1, p.1-5.

LIPTAY, G. Atlas of thermoanalytical curves. Budapest: Heyden, 1971.

LIPTAY, G. Thermal analysis from a numerical aspect. J. Therm. Anal., v.25, p.235-241, 1982.

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

MACKENZIE, R. C. Nomenclature for thermal analysis IV: Recommendations 1985. Pure Appl. Chem., v. 57, p.1738, 1985.

MAGNUSON, T.H., LILLEMOE, K.D., ZARKIN, B.A., PITT, H.A. Patients with uncomplication cholelithiasis acidify bile normally. Dig. Dis. Sci., v.37, n.10, p.1517-1522, 1992.

MALET, P. F., TAKABAYASHI, A., TROTMAN, B.W., SOLOWAY, R. D., WESTON, N.E. Black and brown pigment gallstones differ in microstructure and microcomposition. Hepatology, v.4, p.227-234, 1984.

MARKKANEN, T., AHO, A. J. Metabolic aspects of trace metal content of gallstones and gallbladders. Acta Chirurgica Scand., v.138, p.301-305, 1972.

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

MCCLENNEN, W. H. BUCHANAN, R.M.; ARNOLD, N.S.; DWORZANSKI, J.P.; MEUZELAAR, H.L.C. Thermogravimetry/gas chromatography/mass spectrometry and thermogravimetry/ gas chromatography/ fourier transform infrared spectroscopy: novel hyphenated methods in thermal analysis. Anal. Chem., v.65, p.2819, 1993.

MCGHIE, A. R. Simultaneous thermogravimetry-differential thermal analysis-mass spectrometry (TG-DTA-MS) using a heated capillary interface. Thermochim. Acta, v.234, p.21, 1994.

McNAUGHTAN, J. L., MORTIMER, C. T. Differential scanning calorimetry. Perkin Elmer, Norwalk, [extraído de IRS, Physical Chemistry], Series 2, v.10, London: Butherworths, 1975.

MEISEL, T. To what extent is thermal analysis an analytical method ?. J. Therm. Anal., v.29, p.1379-1392, 1984.

MERCK index. 11.ed., Rahway, 1989.

MIYANO, M.H., NARIMATSU, L.E.S., WANDERMUREN, M. N., MATOS, J.R. Resultados de análise elementar associados a termogravimetria. An. Assoc. Bras. de Quím., v.45, n.4, p.185-190, 1996.

MULLENS, J., CARLEER, R., REGGERS, G., YPERMAN, J., VAN POUCKE, L. C. Coupling between FTIR (Bruker IFS 66) and TG (Du Pont TGA 951-2000). Thermochim. Acta, v.212, p.219, 1992.

MURACA, M.; FEVERY, J.; BLANCKAERT, N. Relationships between serum bilirubins and production and conjugation of bilirubin. Studies in Gibbert's syndrome, Crigler-Najjar disease, hemolytic disorders and rat model. Gastroenterology, v.92, p.309-317, 1987.

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).

NAKANISHI, K. Infrared absorption spectroscopy: practical. San Francisco: Holden-Day; Tokyo: Nankodo, 1962.

NAKAMOTO, K. Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds. 4 ed., New York: John Wiley, 1986.

NYQUIST, R.A., KAGEL, R. O. Infrared spectra of inorgânic compounds. New York: Academic Press, 1971.

OSTROW, J.D. The etiology of pigment gallstones. Hepatology, v.4, p.215S-222S, 1984.

OSTROW, J.D. Unconjugated bilirubin and cholesterol gallstone formation. Hepatology, v.12, p.219S-226S, 1990.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S. Introduction to spectroscopy. 2.ed., Orlando: Saunders, 1996.

PERKIN ELMER CORPORATION. Elemental Analyser CHN 2400. Norwalk, 1988. [Manual de Instruções].

PIKUS, D., HICKS, M.E., DARCY, M.D. Percutaneous cholecystolithotomy: analysis of results and complications in 58 consecutive patients. Radiology. v. 183, p.779-784, 1992.

POLK, H.C. Carcinoma and the calcified gallbladder. Gastroenterology, v. 50, p.582-585, 1966.

POST, J. E. , BISH, D.L. Rietveld refinement of crystal structure using powder X-ray diffraction data. Rer. Mineral., V.20, p.300-304, 1989.

POUCHERT, C.J. The aldrich library of infrared spectra. 2.ed. Milwankee: Aldrich Chemical, 1975. p.1576.

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

ROCHA, A. Litíase da vesícula biliar em material de autópsia no triângulo mineiro. Rev. Assoc. Med., Brasil, v.23, p.196-198, 1977.

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

SAUERBRUCH, T., STELLARD, F., SUEHENDRA, N., PAUMGARTNER, G. Cholesteringehalt von gallengangssteinen. Dtsch. Med. Wochenschr., v.108, p.1099-1102, 1983.

SCHWARTZ, SHIRES, SPENCER, STORER. Principles of Surgery. 4. ed. New York: Ed. McGraw Hill, 1982.

SHEILA, S. Diseases of the liver and biliary system. 5.ed., London: Blackwell Scientific Publication, 1975.

SHIMADZU CORPORATION. Analytical Instruments Division. Diferencial scanning calorimetry DSC-50. Japan, 1989. [Manual de Instrução].

SHIMADZU CORPORATION. Testing & Weighing Equipament Division. Thermogravimetric analyzer TGA-50 e TGA-51H, Japan, 1989, 1995ª. [Manual de Instrução].

SMALL, D.M. Gallstones. N. Engl. J. Med., v.270, p.588, 1968.

SMALL, D.M. The formation of gallstones. Adv. Intern. Med., v.16, p.243, 1970.

SOLOWAY, R.D., FAYASAL, E.B., TROTMAN, B.W., WESTON, N.E., FICCA JR., J.F. Water content of gallstones: lacation and contribution to a hypotesis concerning stone structure. Hepatology, v.2, p.223-229, 1982.

STEDMAN, T. l. Stedman dicionário médico. 25 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.243, 541, 845.

STRASBERG, S.M., CLAVIEN, P.A. Ovierview of Therapeutic Modalities for the Treatment of Gallstone 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.

SUTOR, D.J., WOOLEY, S.E. The nature and incidence of gallstone containing calcium. Gut, v.14, p.215-220, 1973.

SUTOR, D.J., WOOLEY, S.E. The organic matrix of gallstones. Gut., v.5, p.487-491, 1974.

SZABADVARY, F., BUZÁGH-GERE, É. Historical development of thermoanalytical methods. J. Therm. Anal., v.15, p.389-397, 1979.

THISTLE, J.L., CLEARY, P. A., LACHIN, J.M., TYOR, M.P., HERSH, T. The natural history of cholelithiasis. The National Cooperative Gallstone Study. Ann Intern. Med., v. 101, p. 171-175, 1984.

TROTMAN, B.W., MORRIS, T.A., SANCHEZ, H.M., SOLOWAY, R.D., OSTROW, J.D. Pigment versus cholesterol cholelithiasis: identification and quantification by infrared spectroscopy. Gastroenterology, v.72, p.495-498, 1977.

TROTMAN, B.W., BERNSTEIN, S.E., BOVE, K.E., WIRT, G.D. Studies on the pathogenesis of pigment gallstones in hemolytic anemia. J. Clin. Invest., v.65, p.1301-1308, 1980.

TROTMAN, B.W., BONGIOVANNI, M.B., KAHN, M.J., BERNSTEIN, S.E. A morphological study of the liver and gallbladder in hemolysis - induced gallstone disease in mice. Hepatology, v.2, p.863-869, 1982.

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.

WYNGAARDEN, J.C., SMITH, J.R. Tratado de medicina interna. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. P.761-764.

YUEN, H. K., MAPPES, G. W. An automated system for simultaneous thermal analysis and mass spectrometry. Part II. Combination with gas chromatography/ mass Spectrometry. Thermochim. Acta, v.70, p.269, 1983.

ZUSSMAN, J. X-ray diffraction. In: Phisycal methods in determinative mineralogy. Academic Press, Londres, 1967, Apud: FORMOSO, M. L. L., TRESCASES, J. J., DUTRA, C. V., GOMES, C. B., 1984.

APÊNDICE I

Curvas TG/DTG e DSC

- Cálculos Biliares

e

- Biles

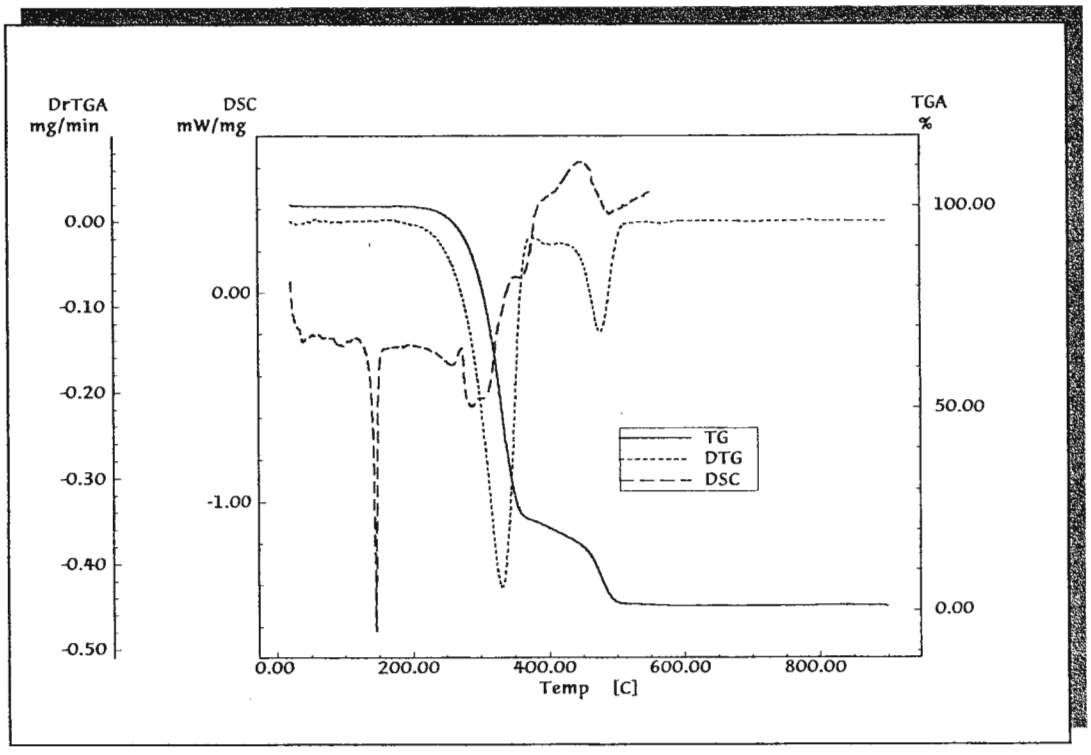

Figura IV.59 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF3

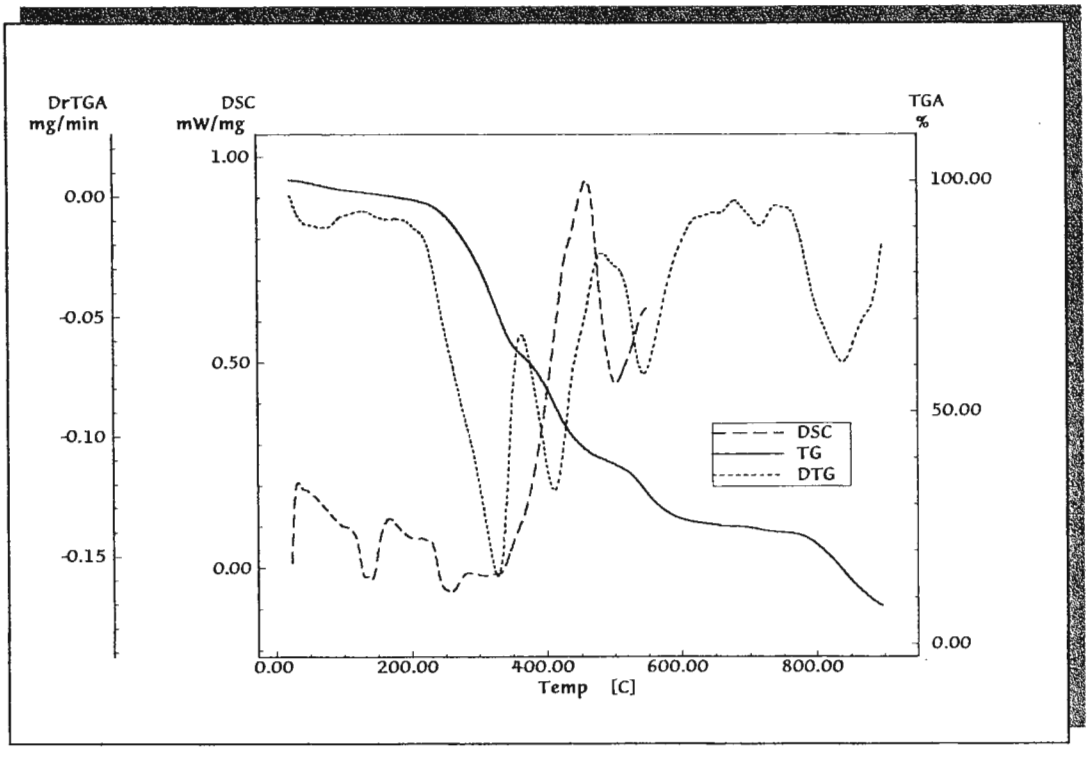

Figura IV.60 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF3

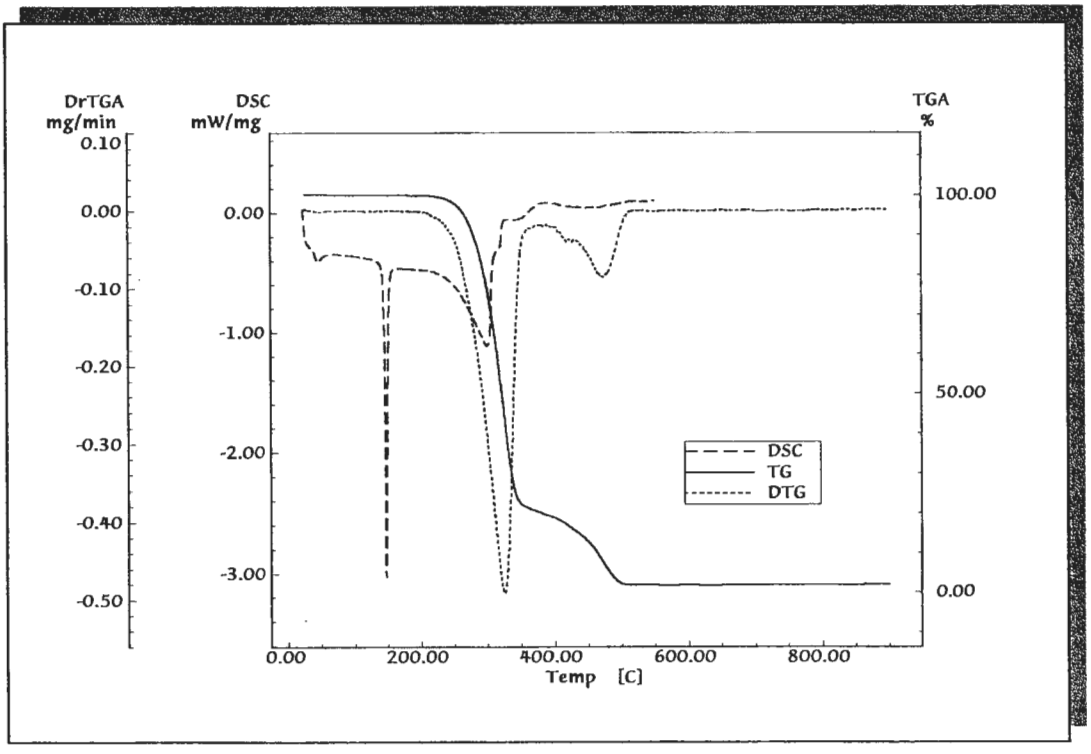

Figura IV.61 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF4

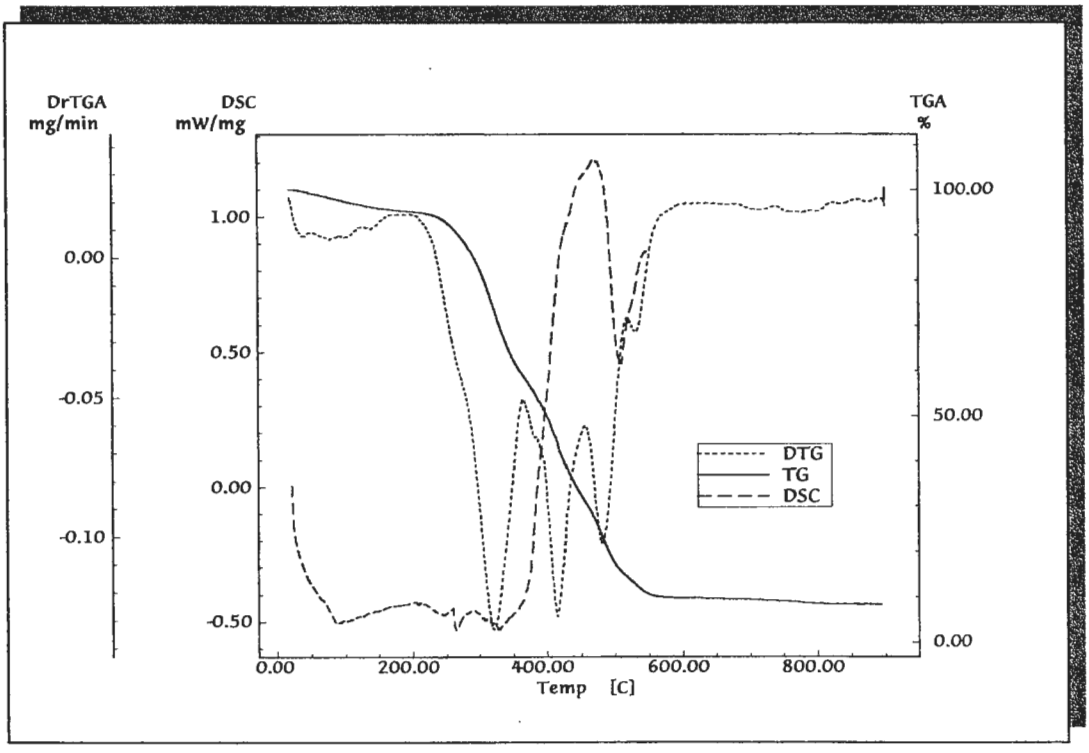

Figura IV.62 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF4

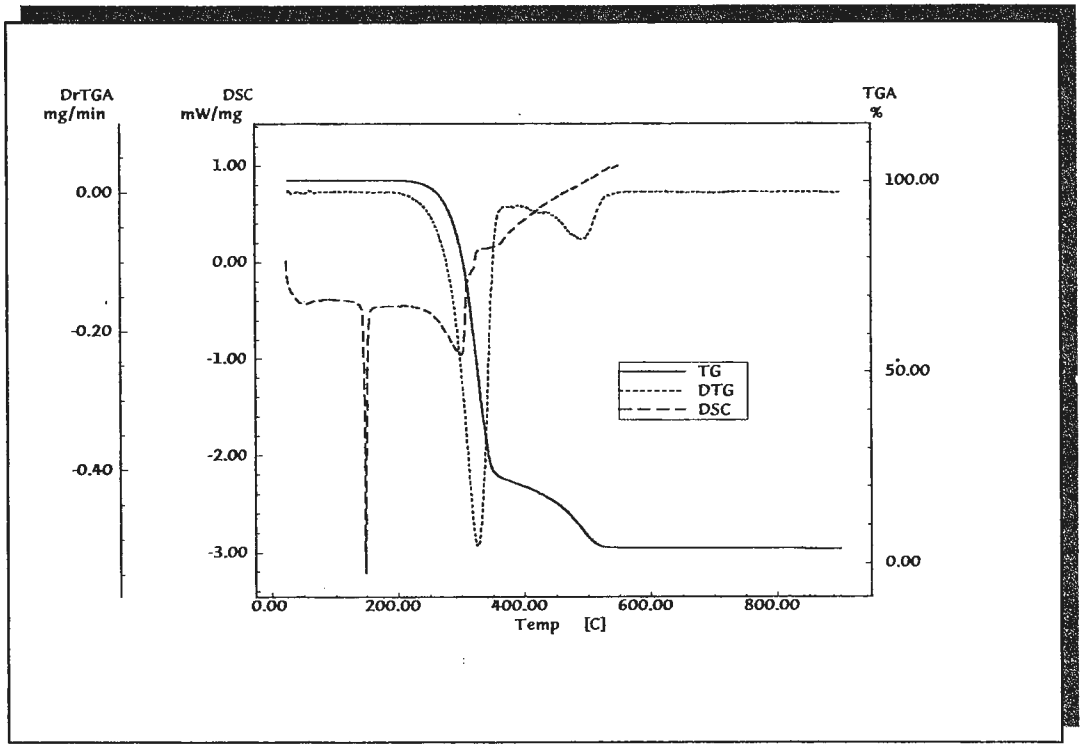

Figura IV.63 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF7

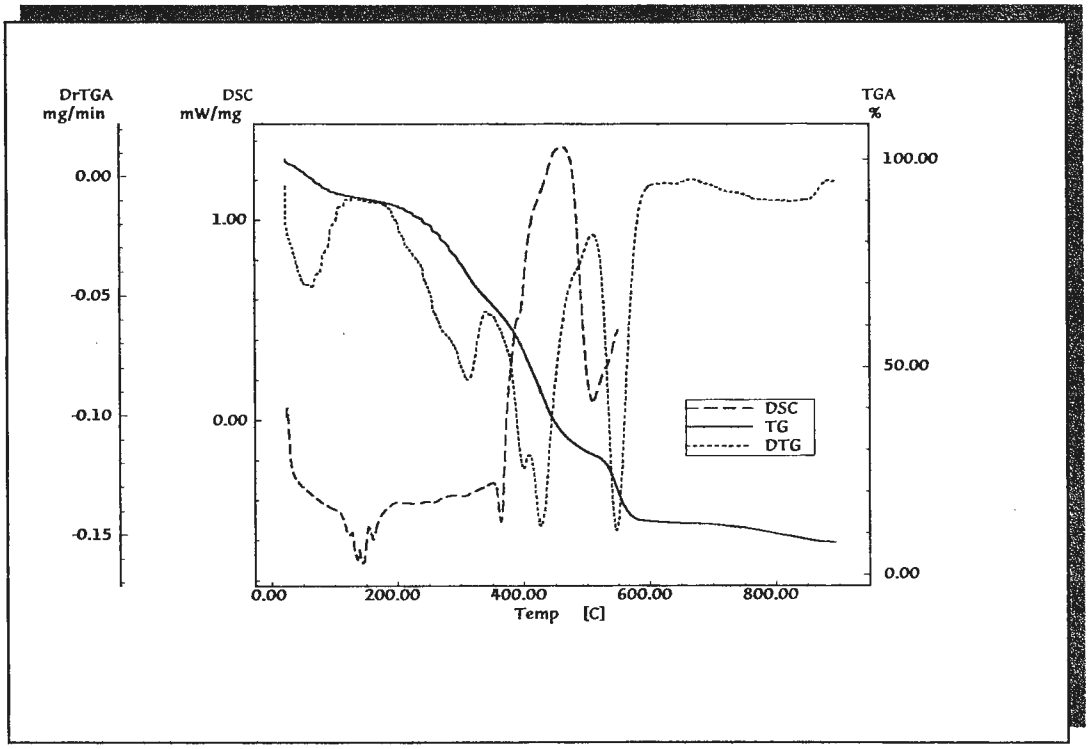

Figura IV.64 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF7

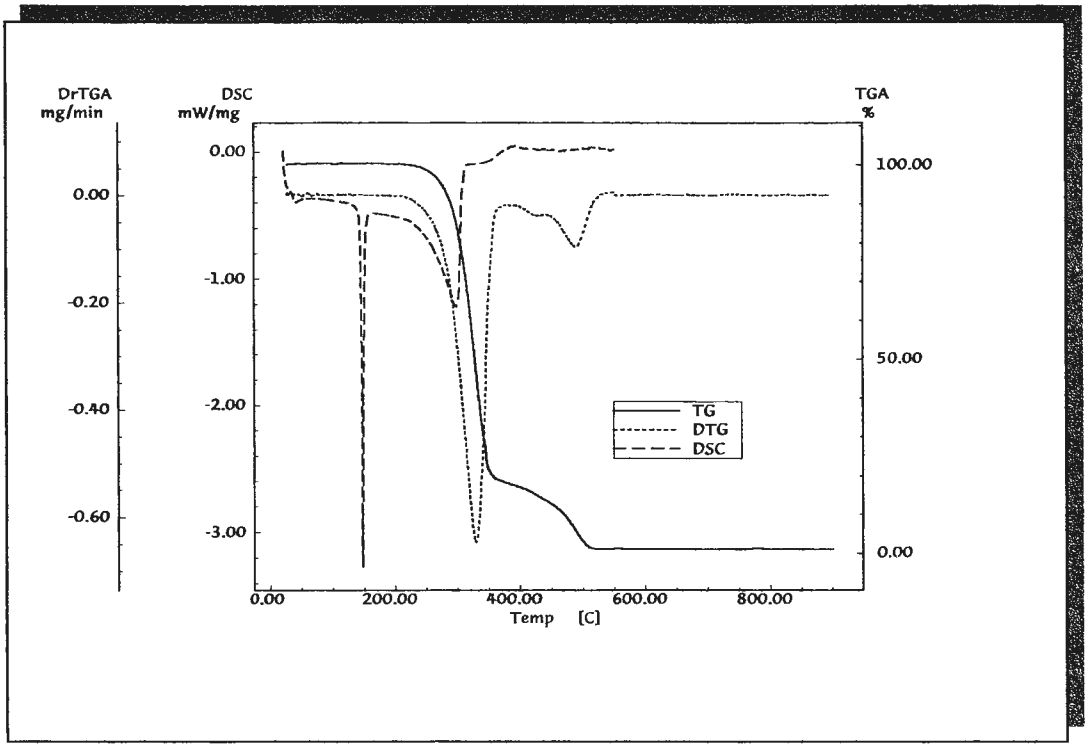

Figura IV. 65 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF8

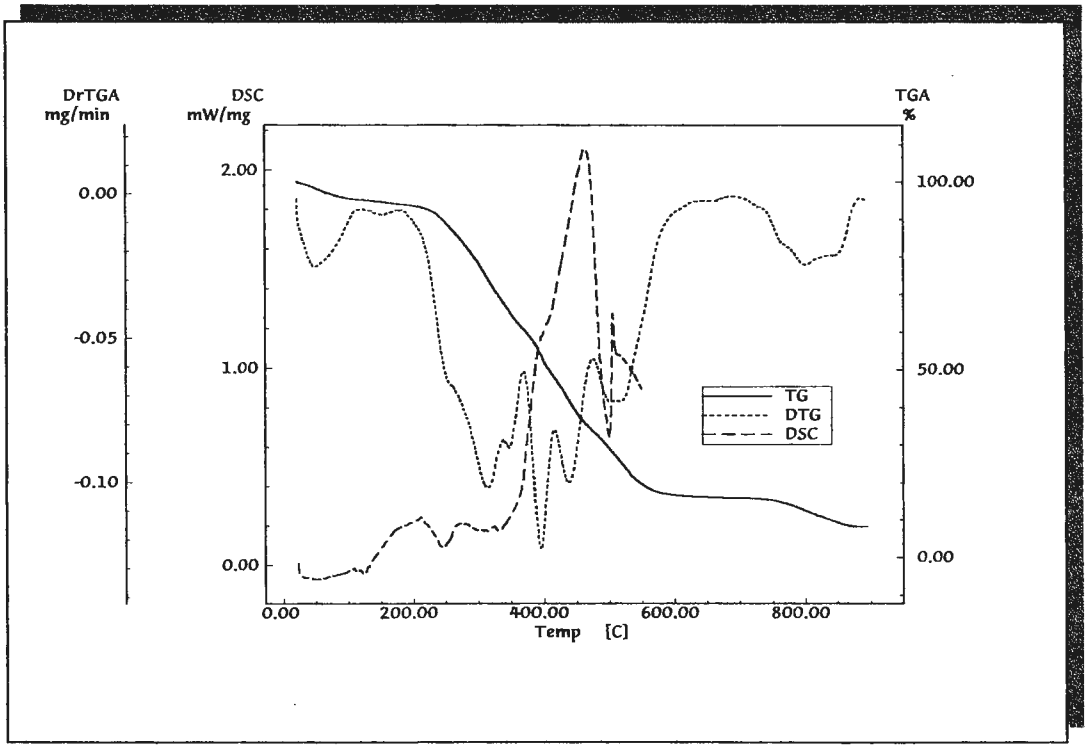

Figura IV. 66 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF8

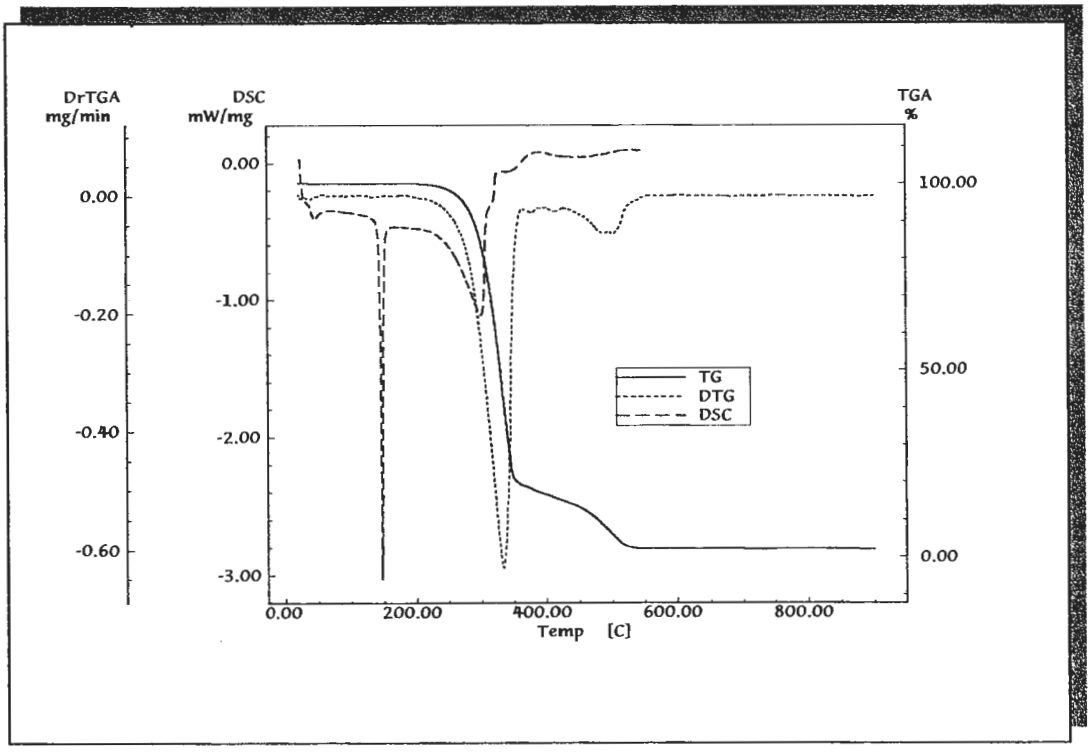

Figura IV. 67 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF9

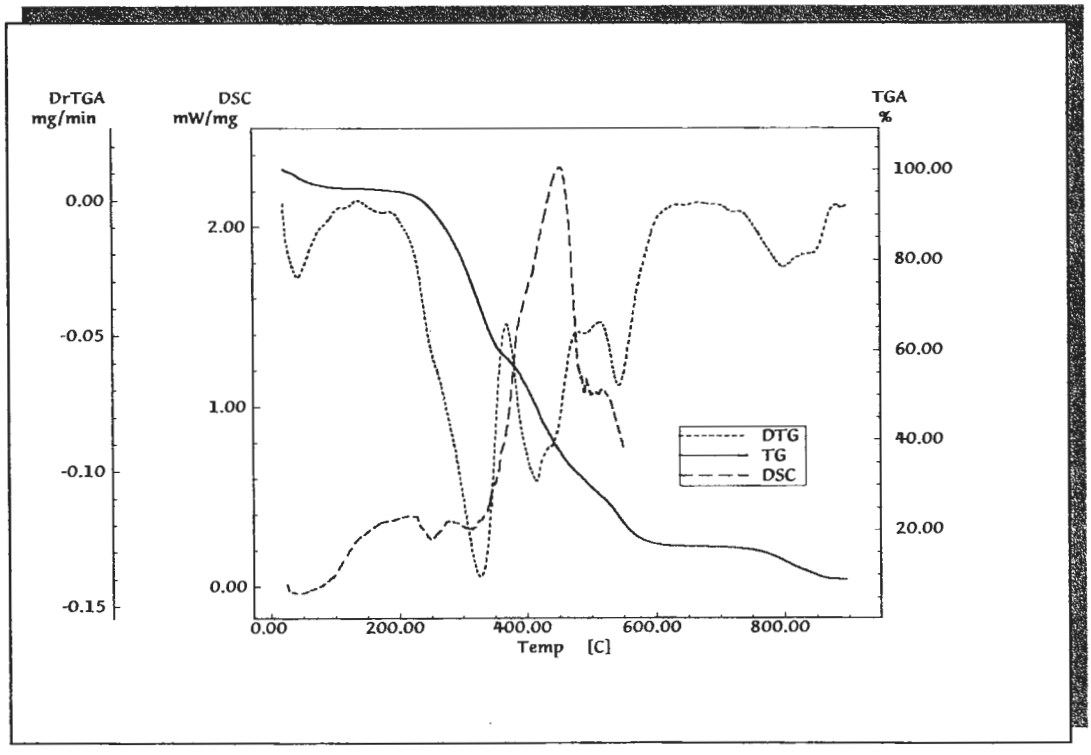

Figura IV.68 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF9

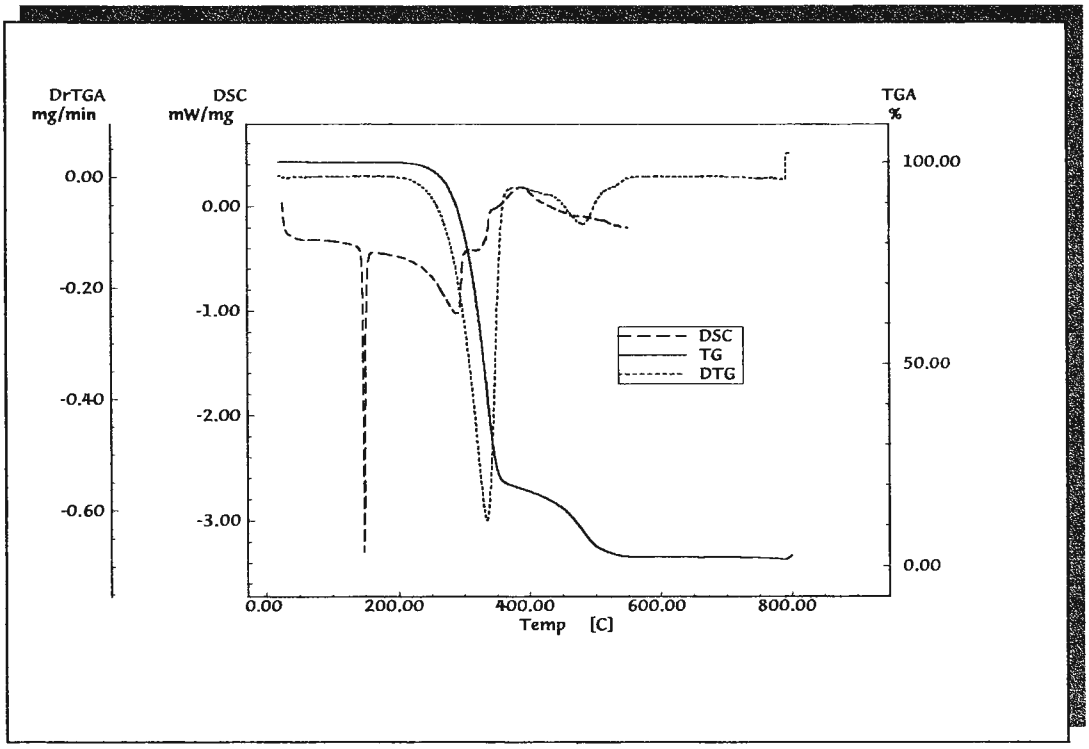

Figura IV.69 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM10

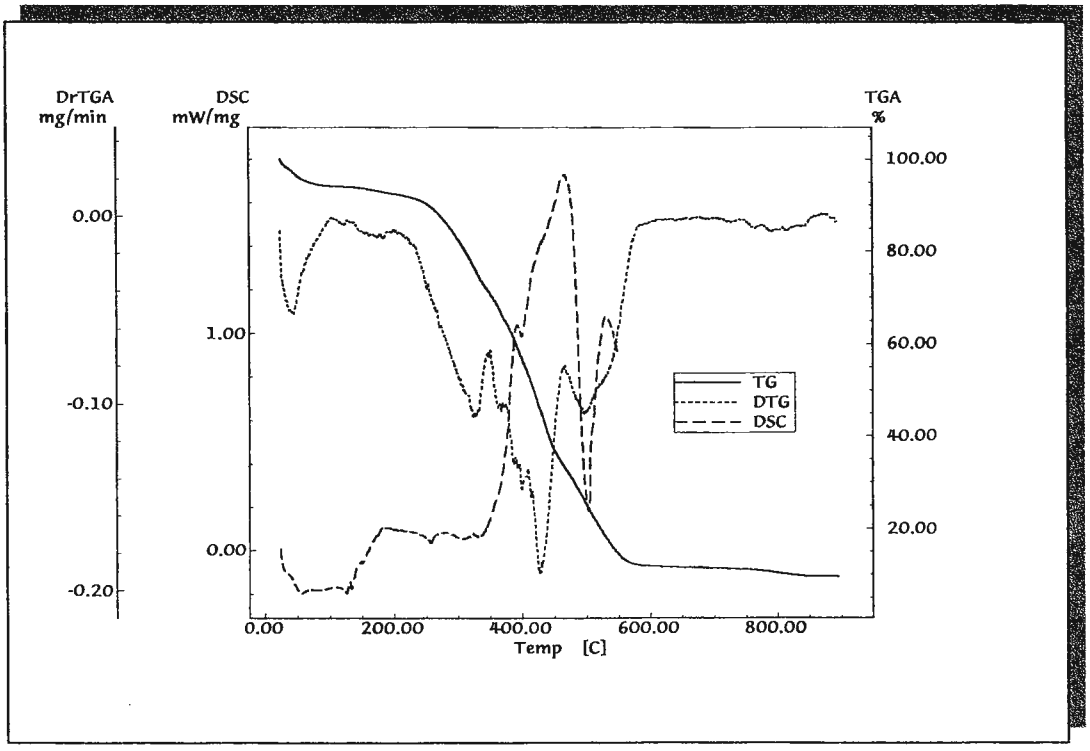

Figura IV. 70 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM10

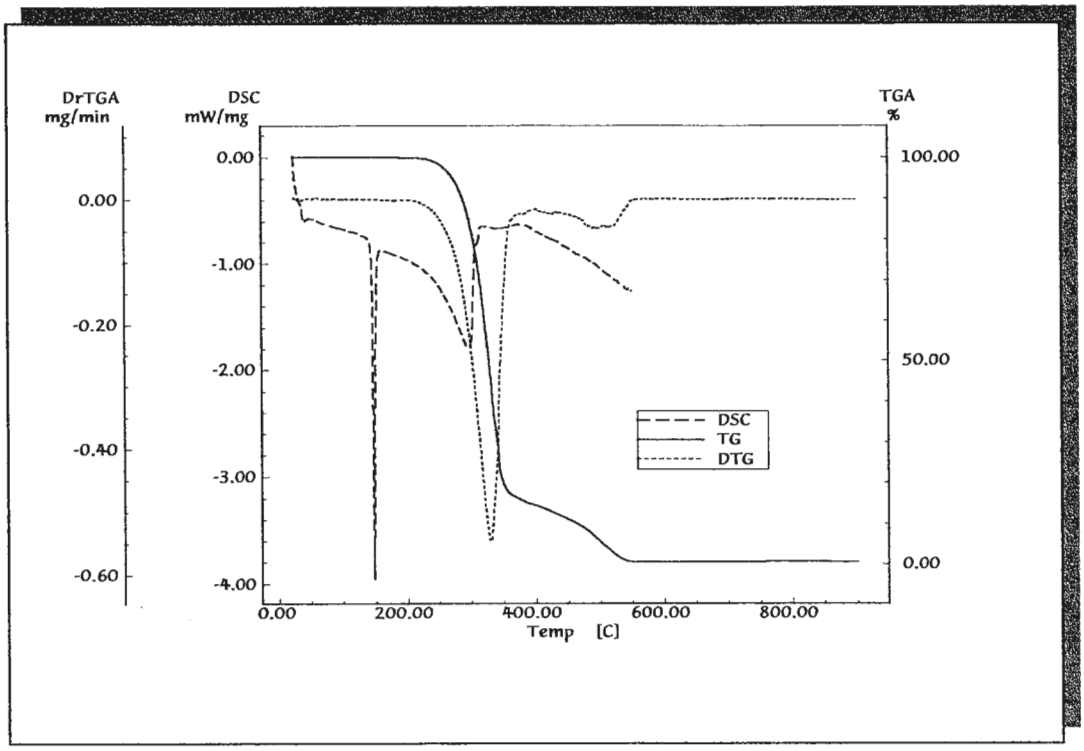

Figura IV. 71 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF12

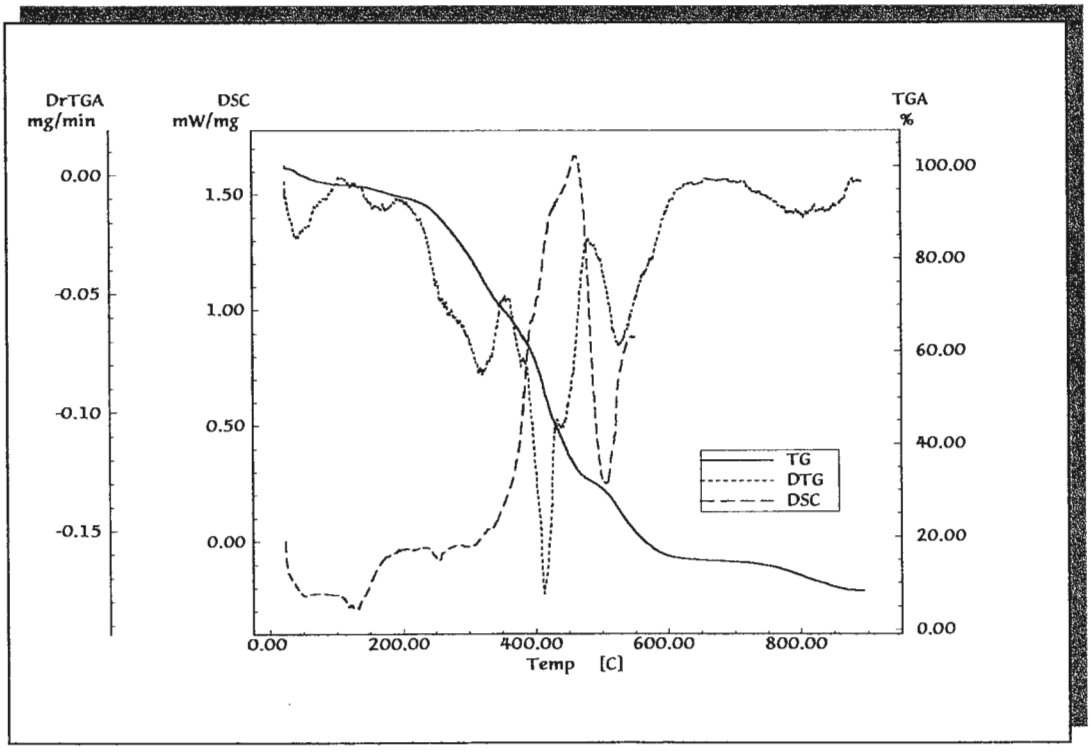

Figura IV.72 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF12

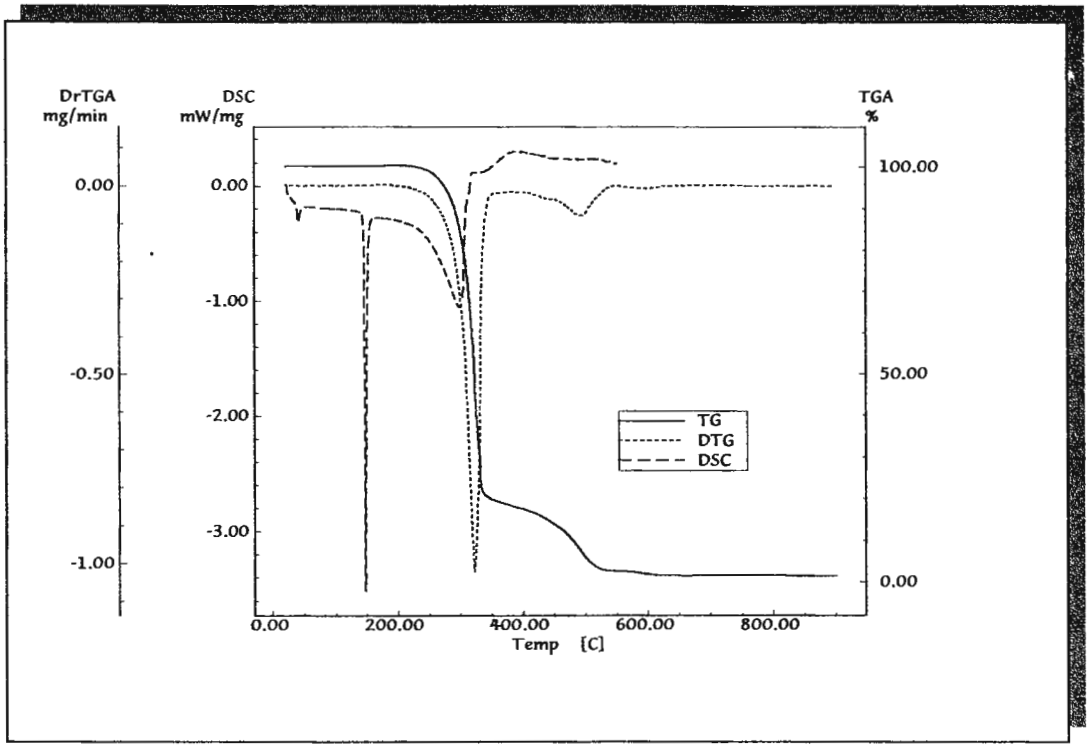

Figura IV.73 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM13

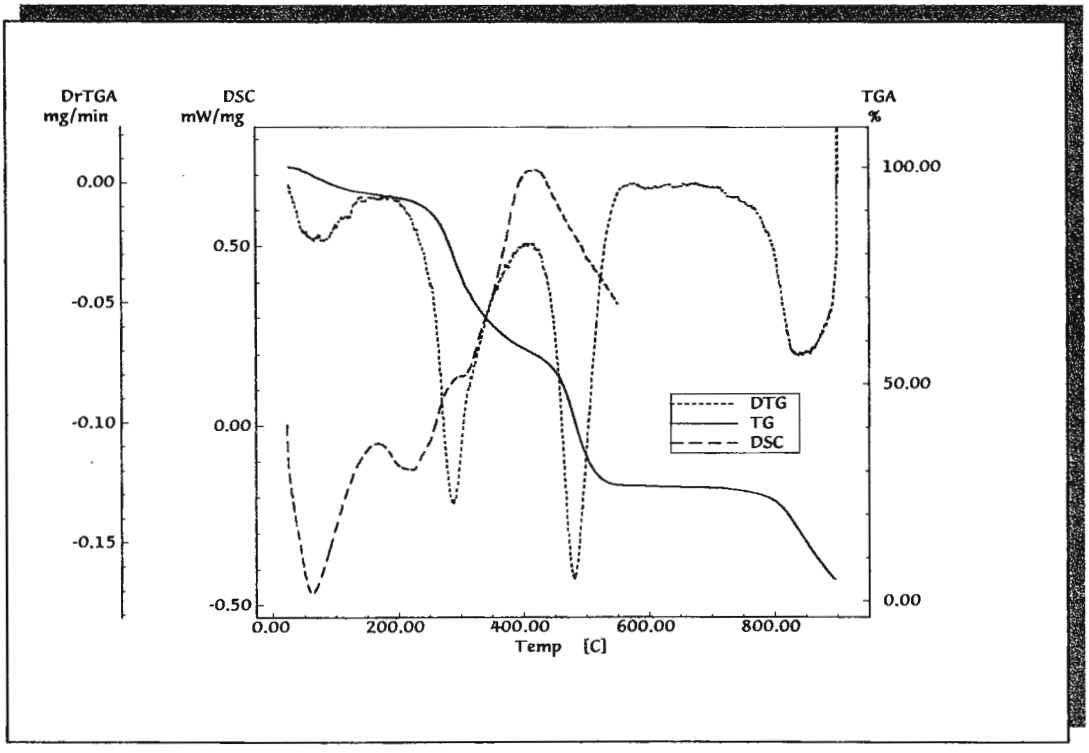

Figura IV.74 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM13

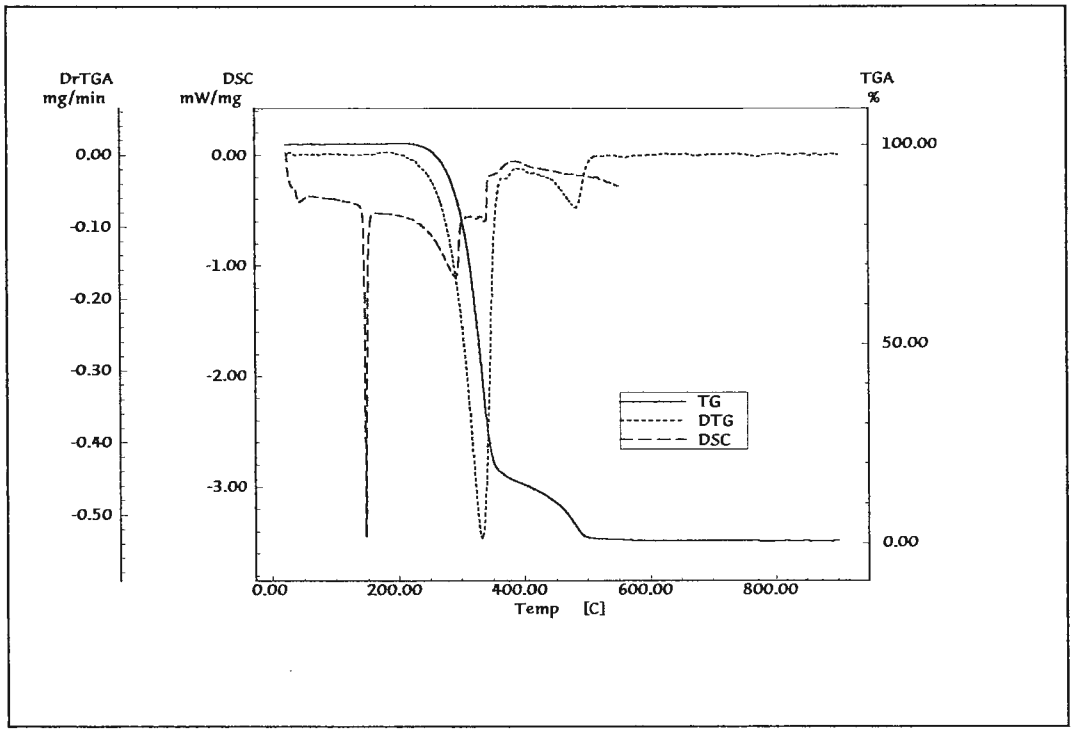

Figura IV. 75 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF14

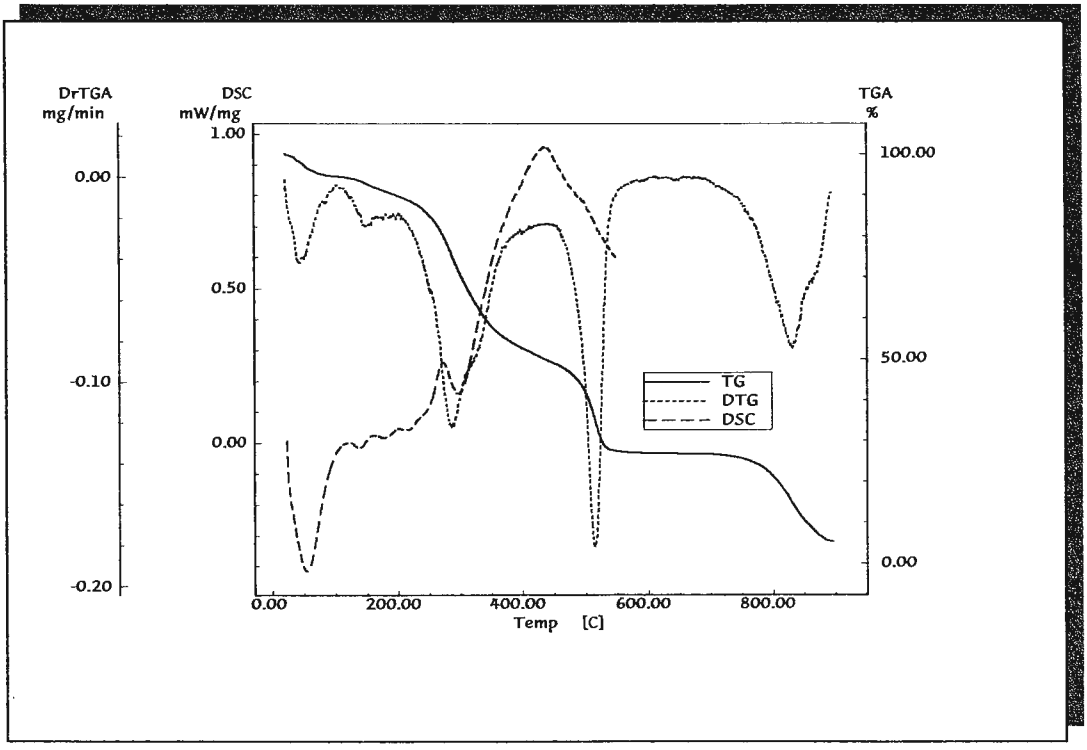

Figura IV. 76 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF14

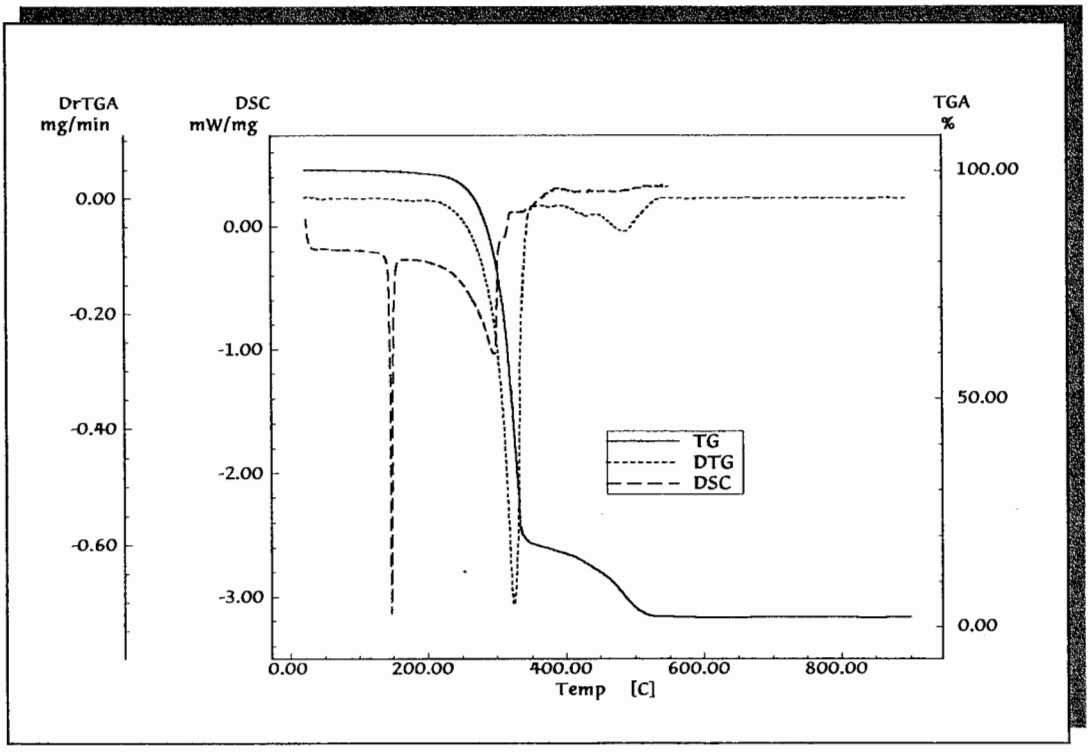

Figura IV.77 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM18

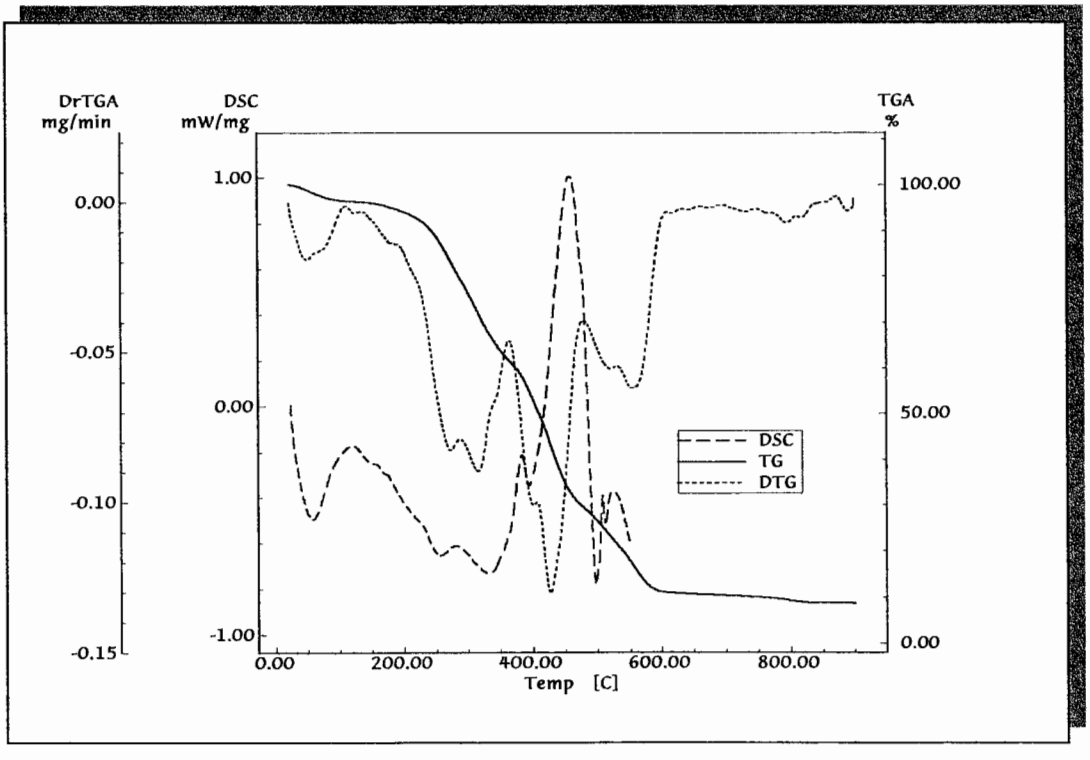

Figura IV.78 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM18

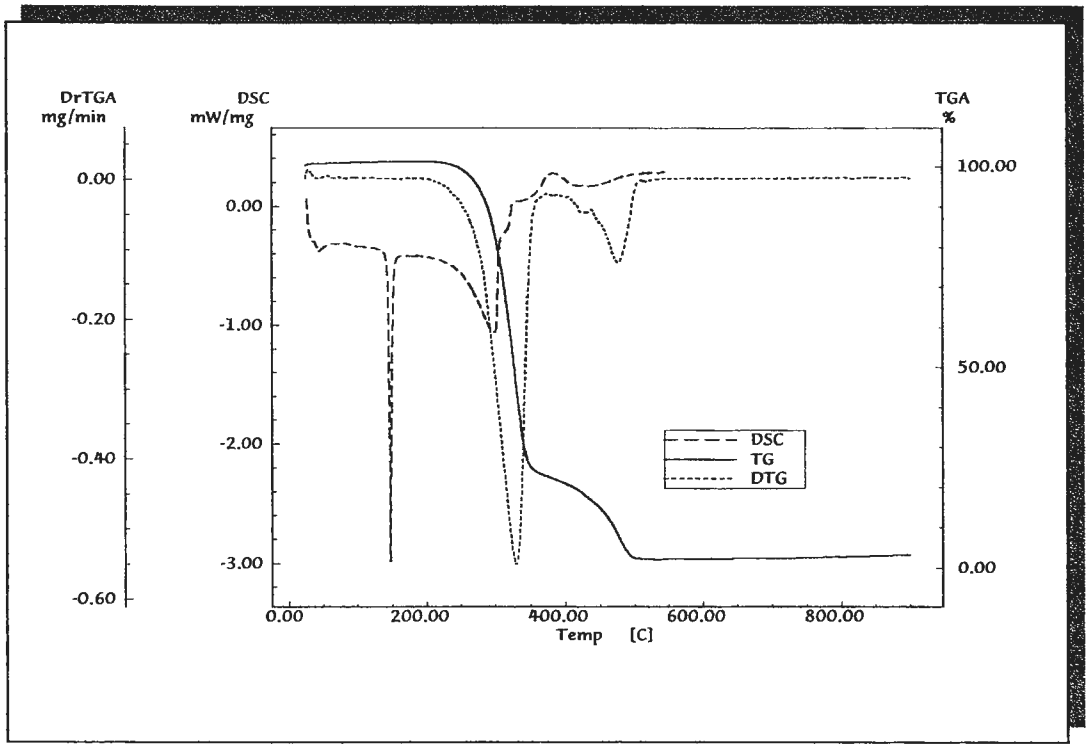

Figura IV.79 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF26

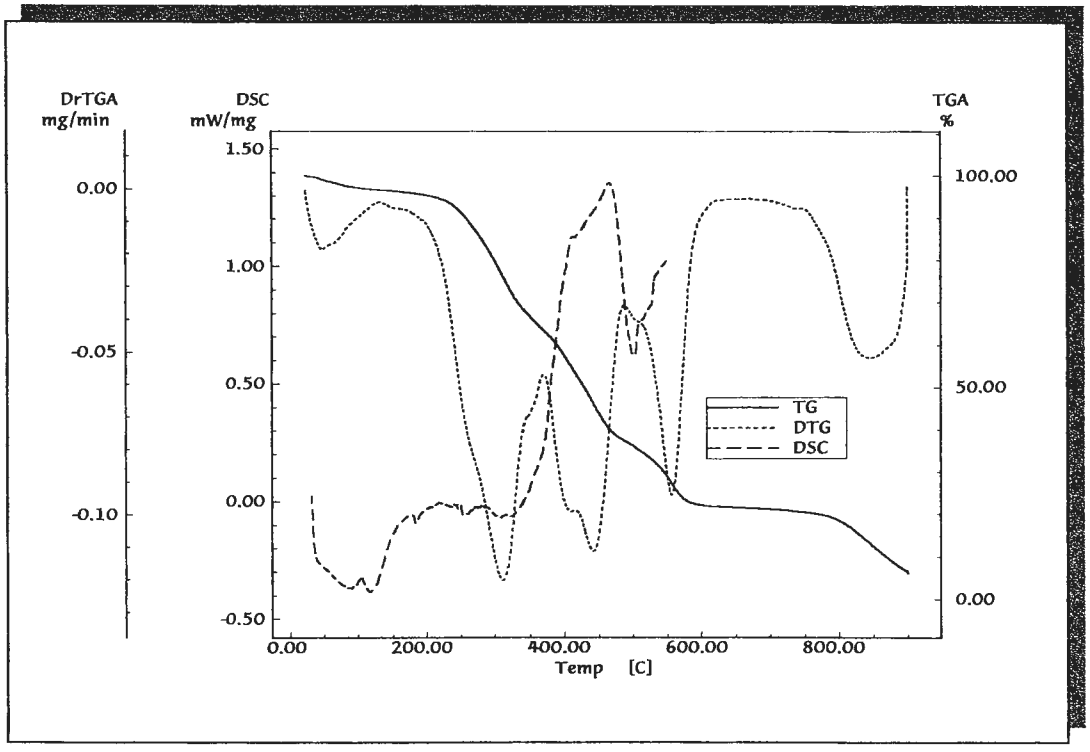

Figura IV.80 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF26

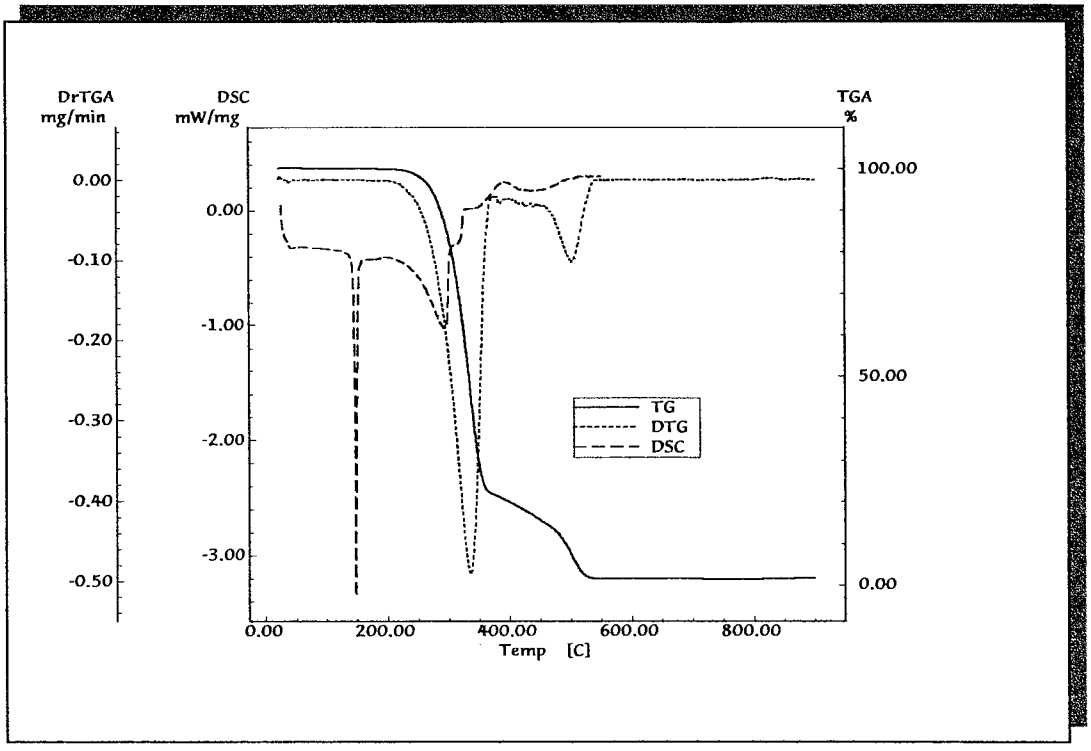

Figura IV.81 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF27

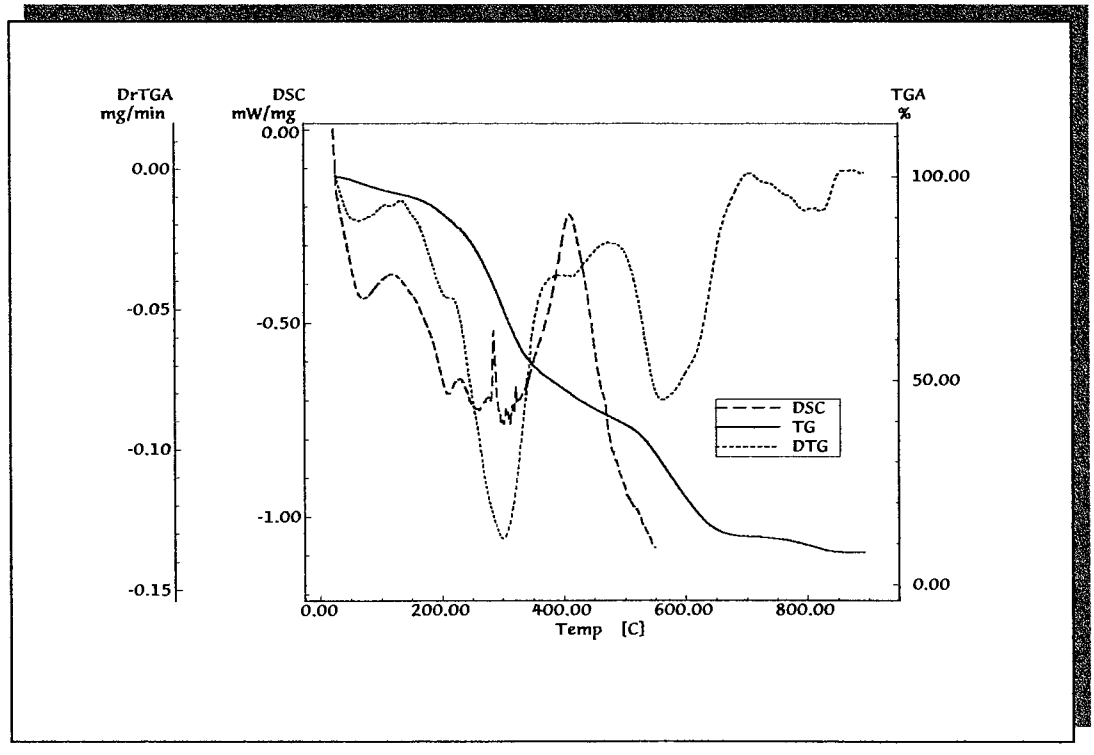

Figura IV.82 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF27

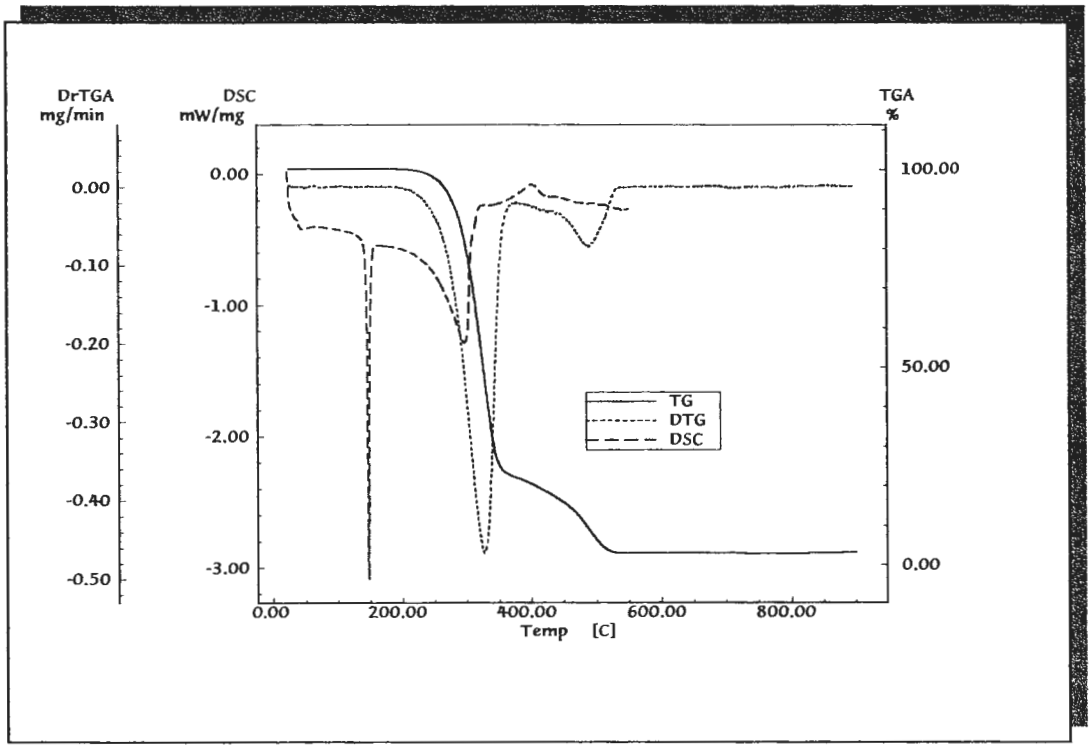

Figura IV.83 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF32

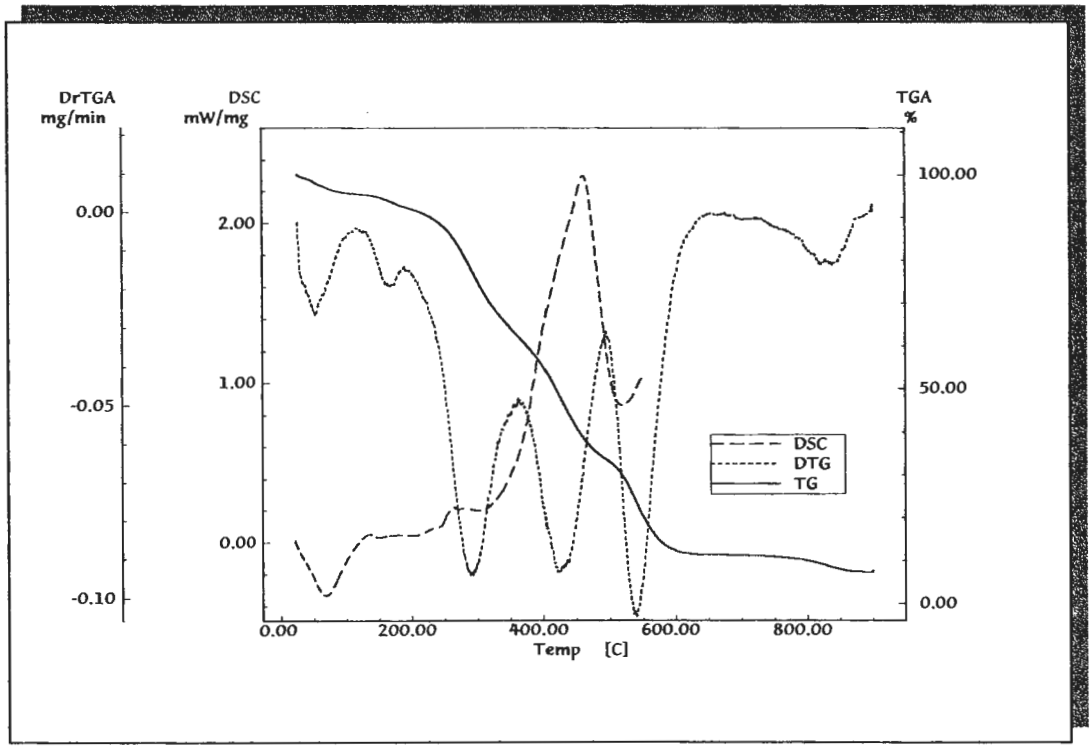

Figura IV.84 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF32

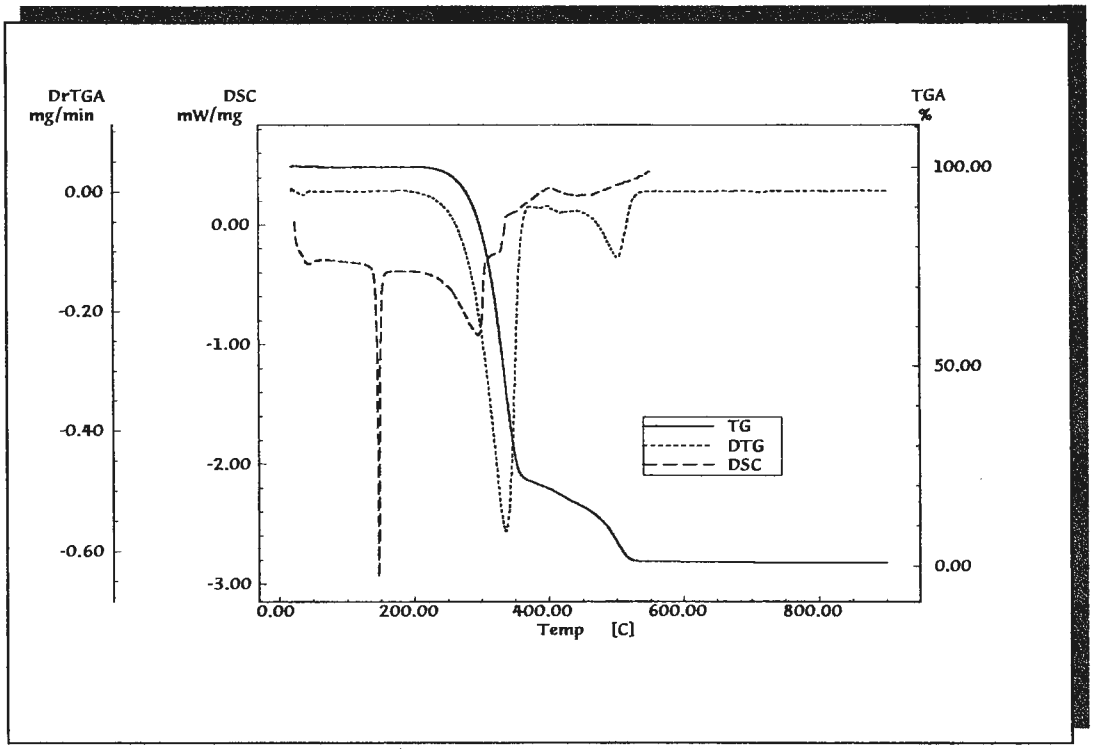

Figura IV.85 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF36

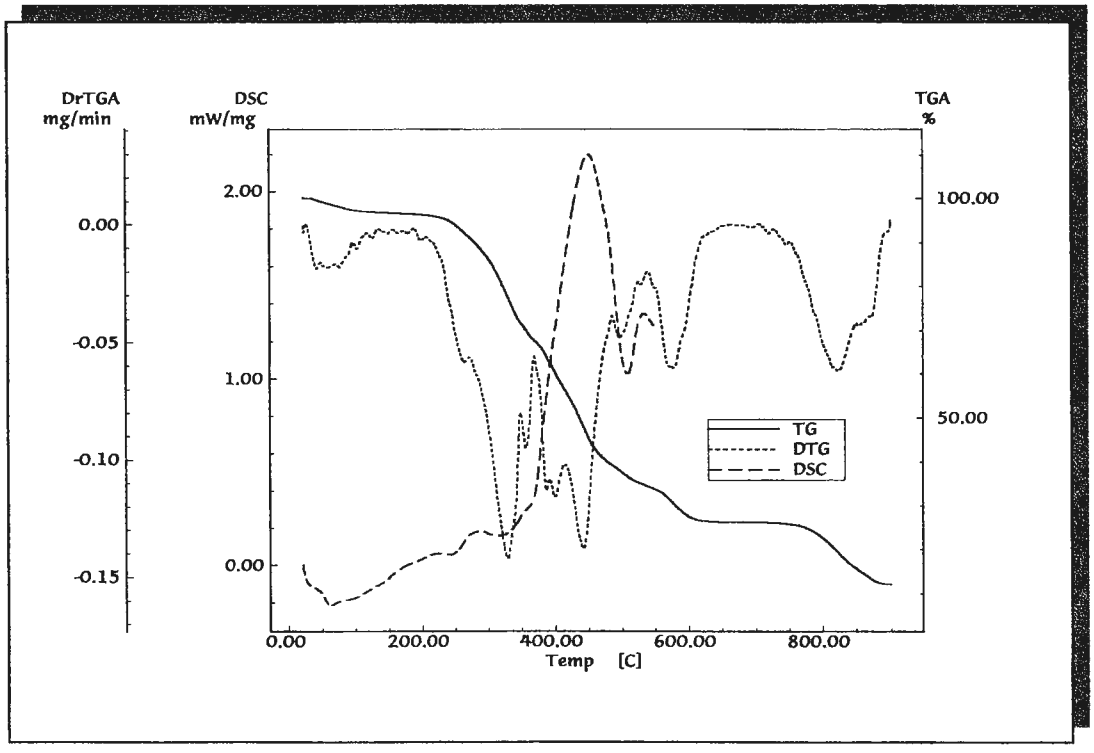

Figura IV.86 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF36

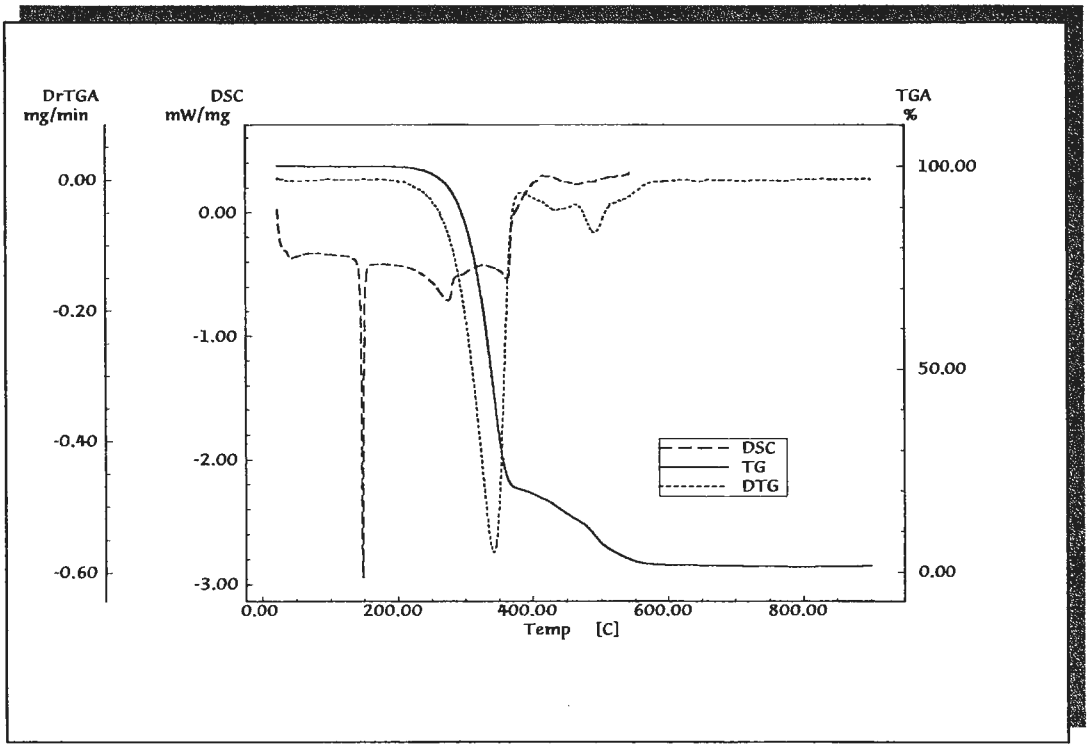

Figura IV.87 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF40

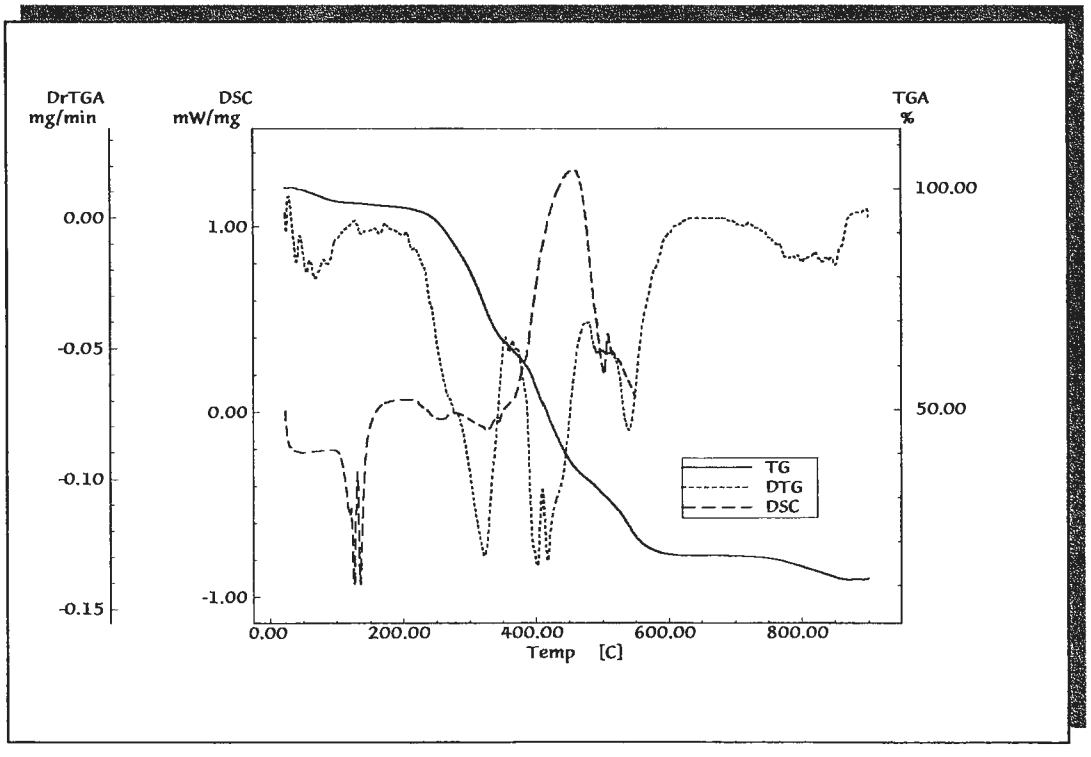

Figura IV.88 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar BF40

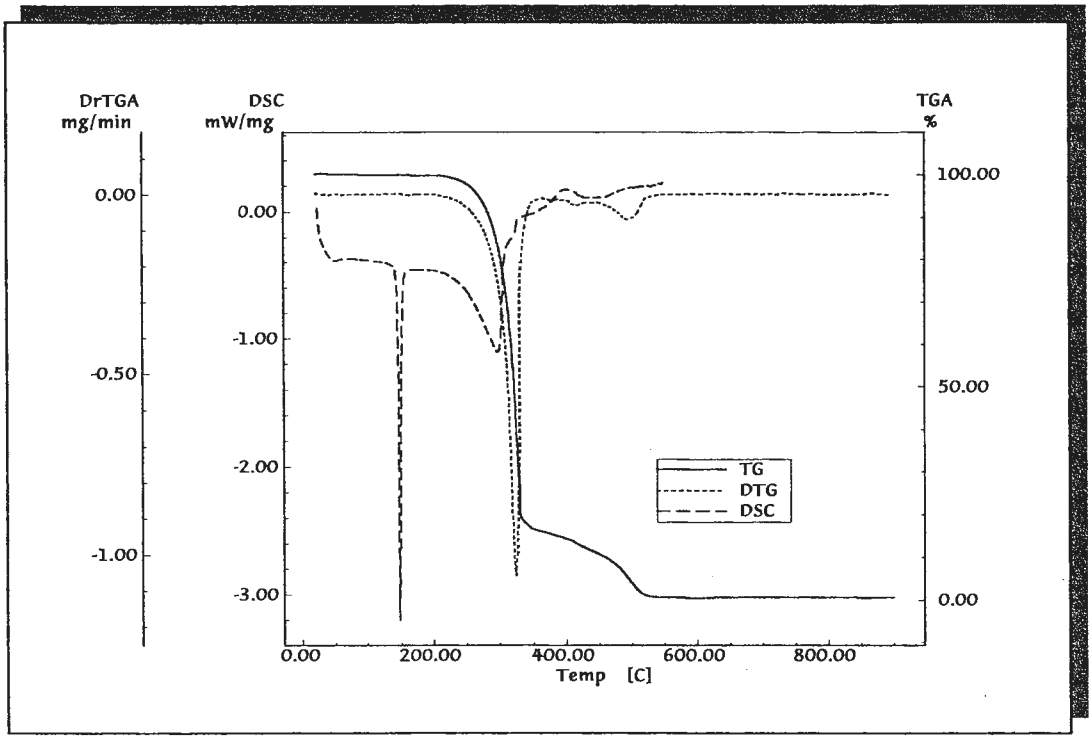

Figura IV.89 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF41

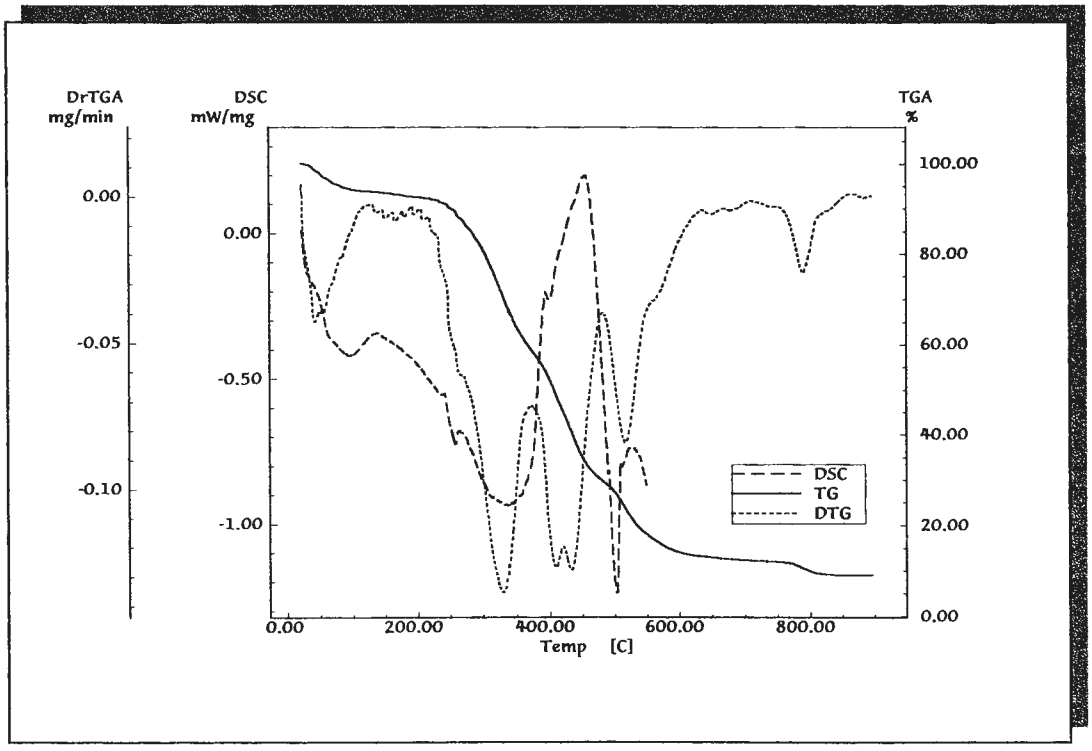

Figura IV.90 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF41

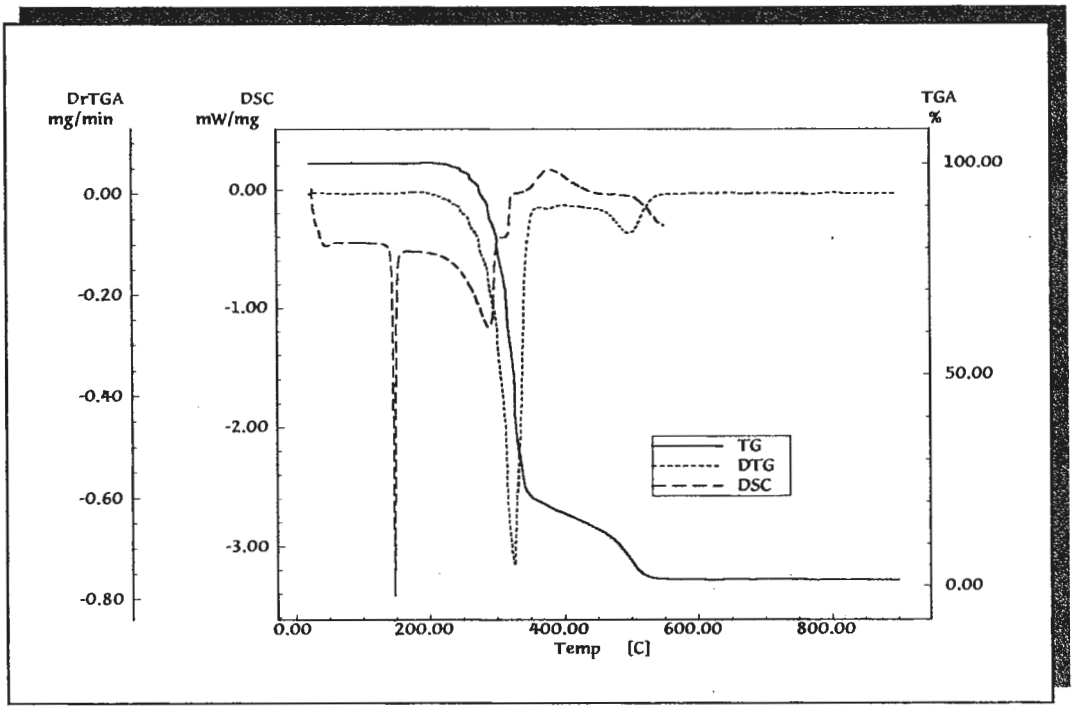

Figura IV.91 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF45

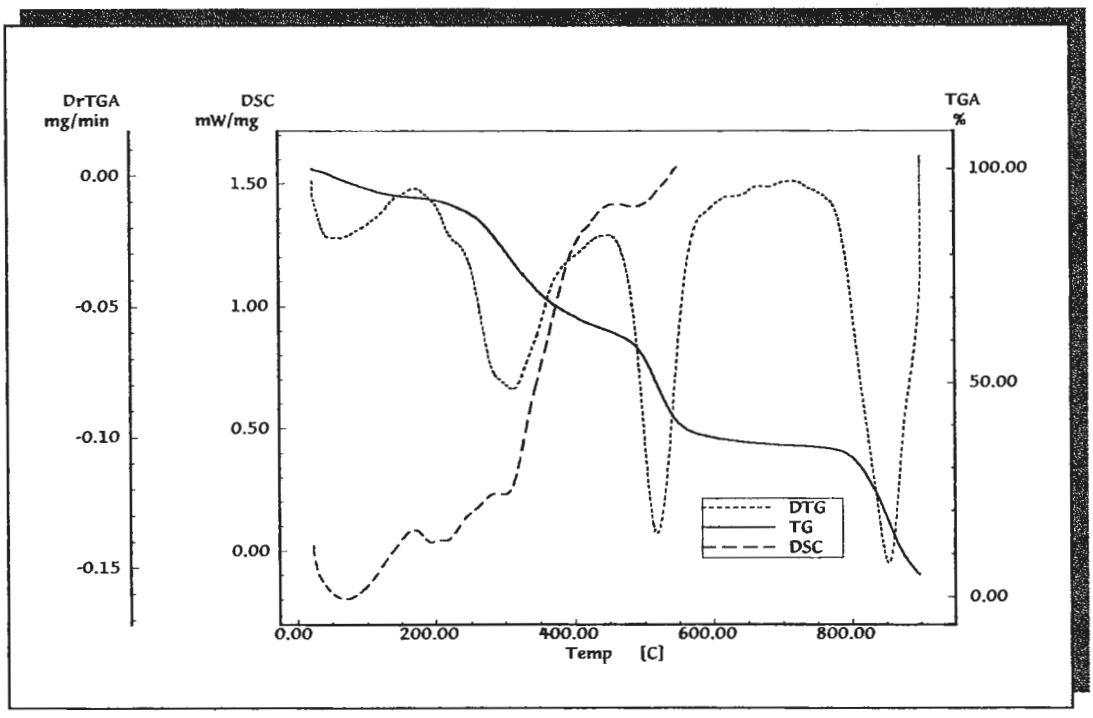

Figura IV.92 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF45

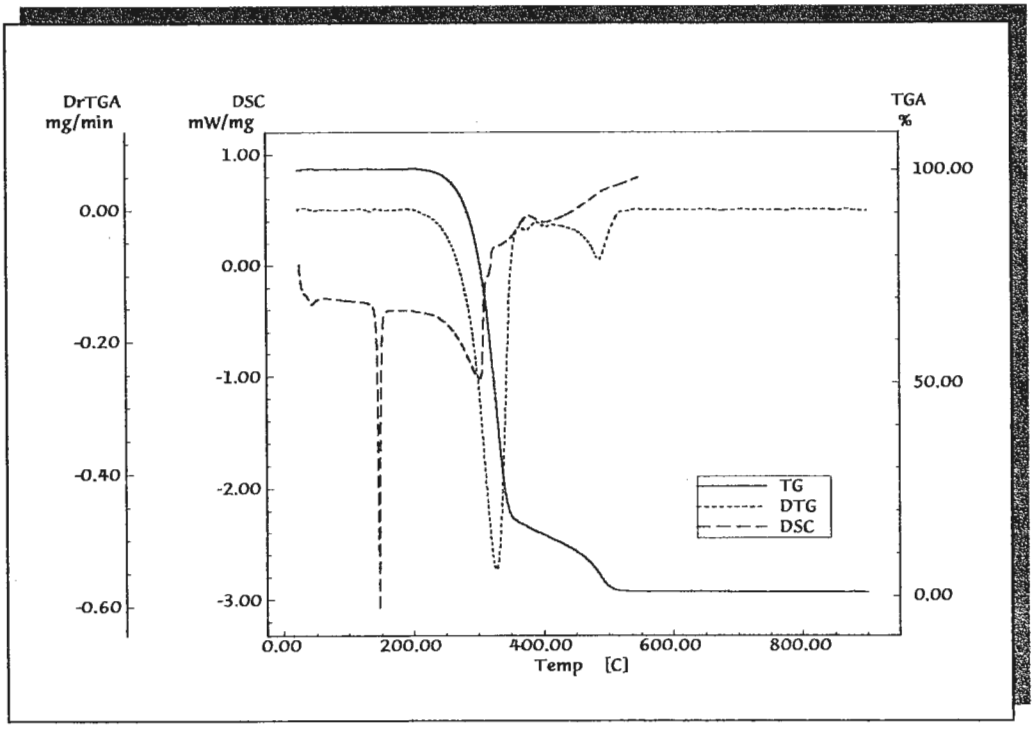

Figura IV.93 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF46

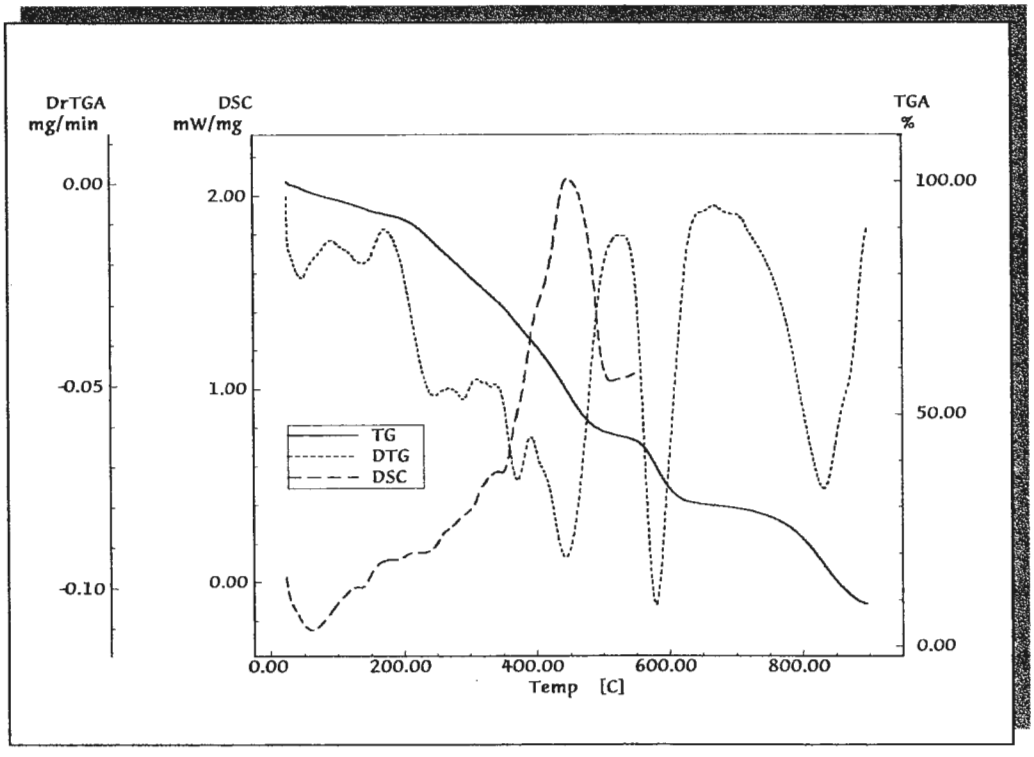

Figura IV.94 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF46

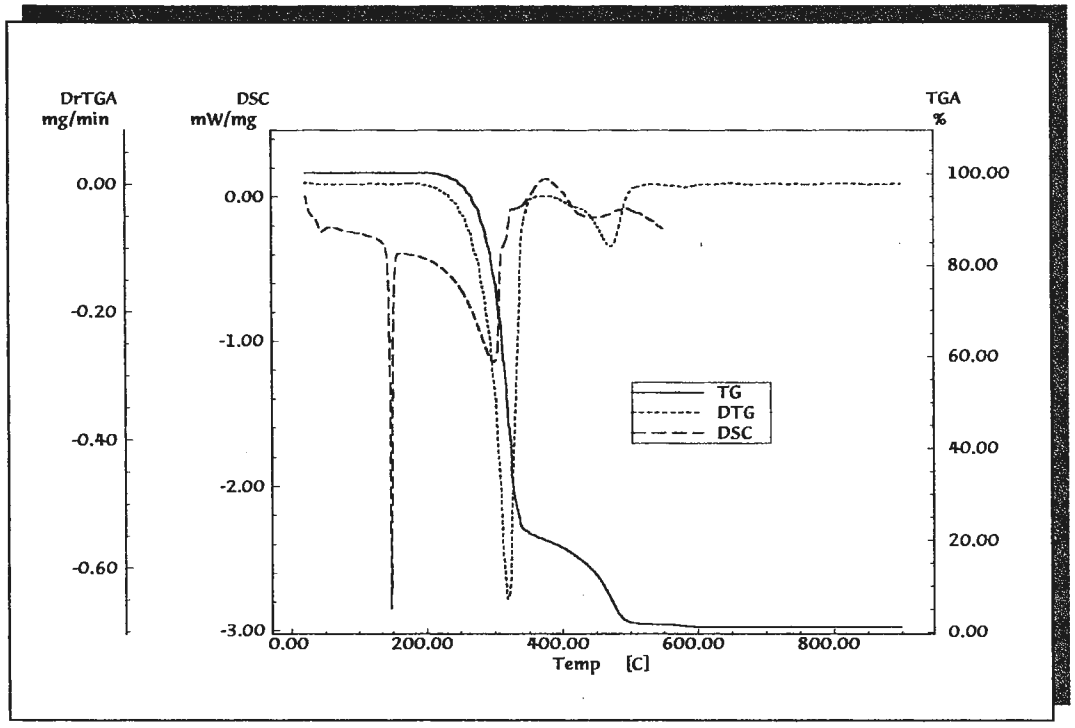

Figura IV.95 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF50

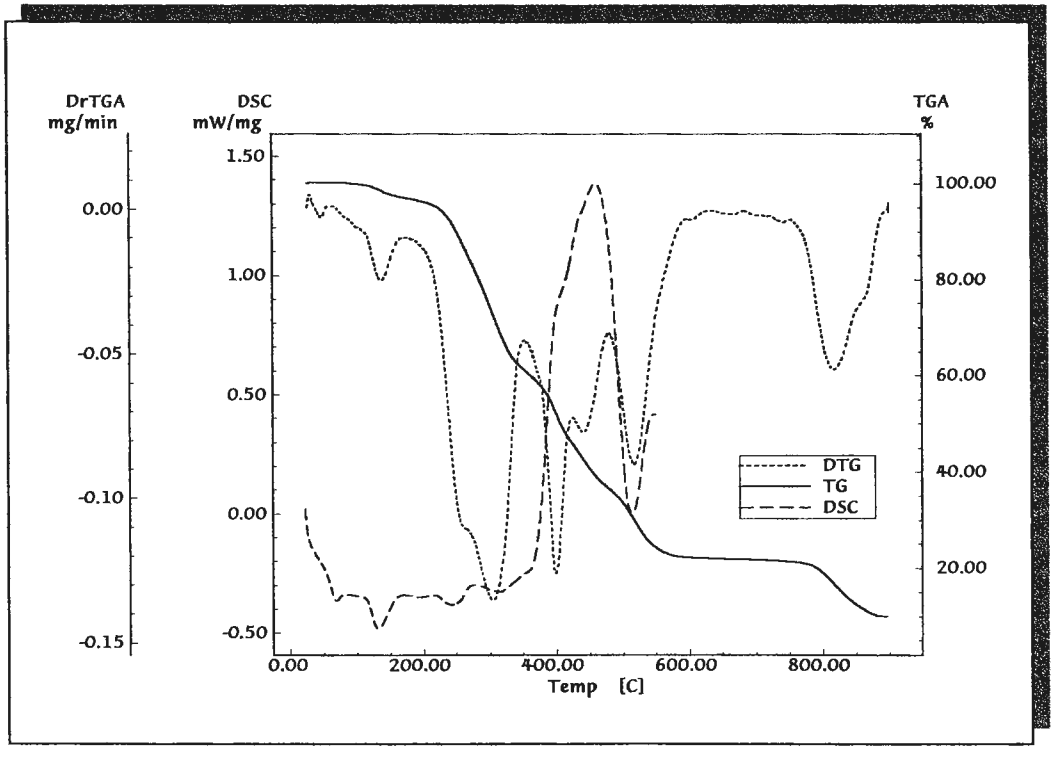

Figura IV.96 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF50

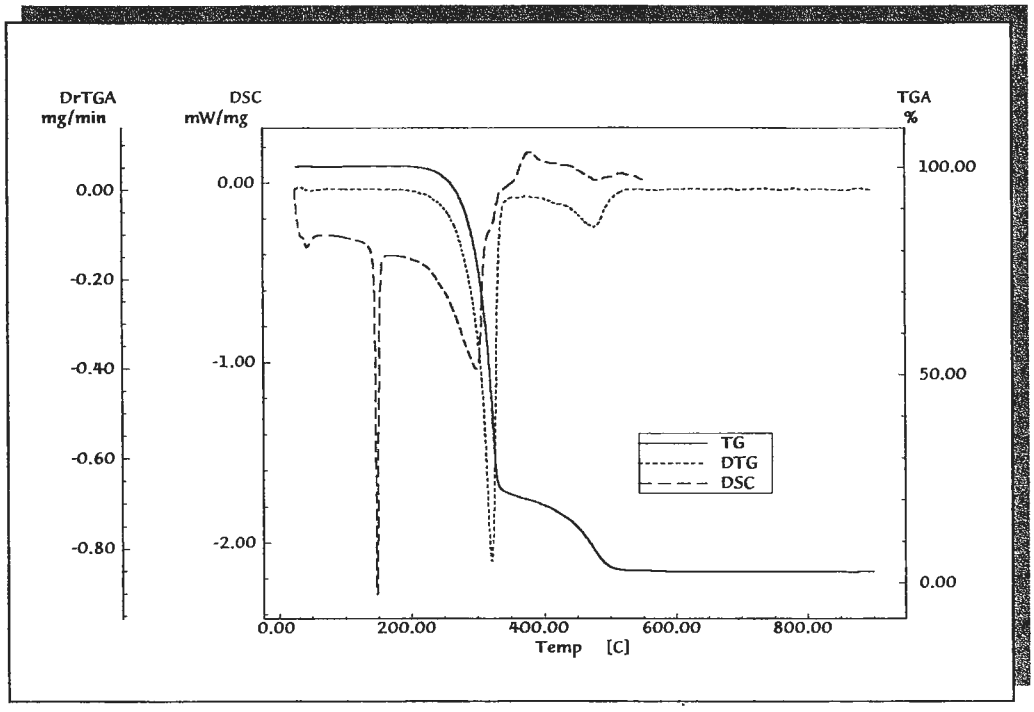

Figura IV. 97 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF53

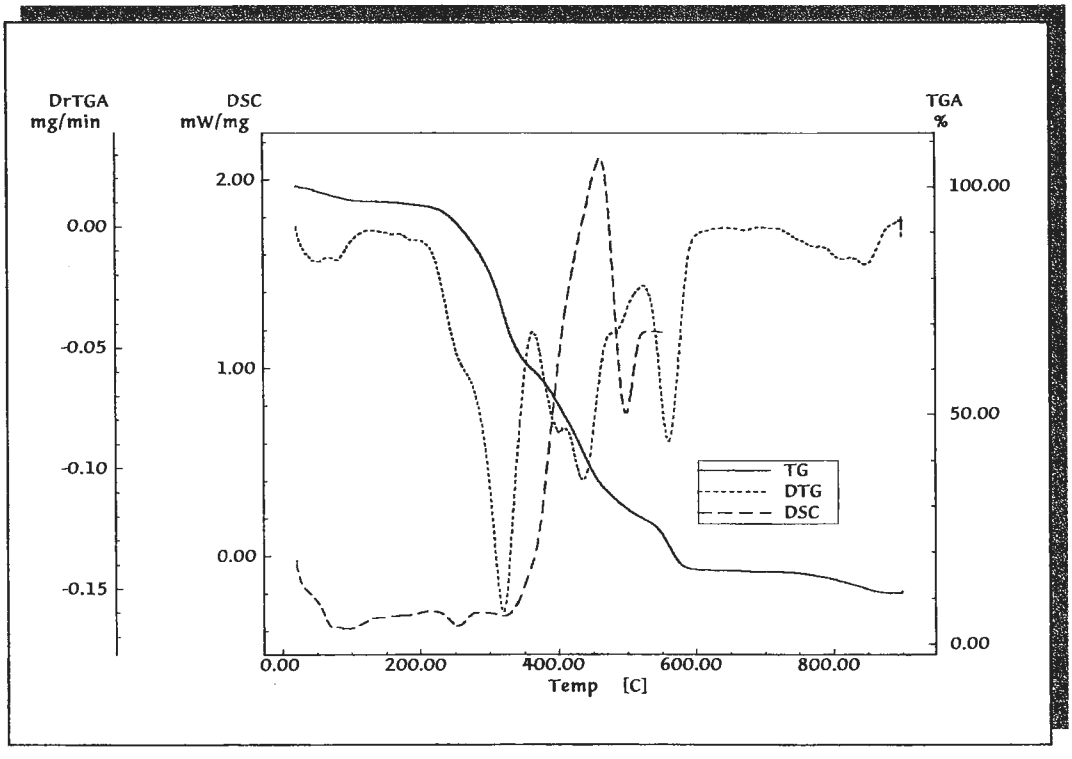

Figura IV. 98 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF53

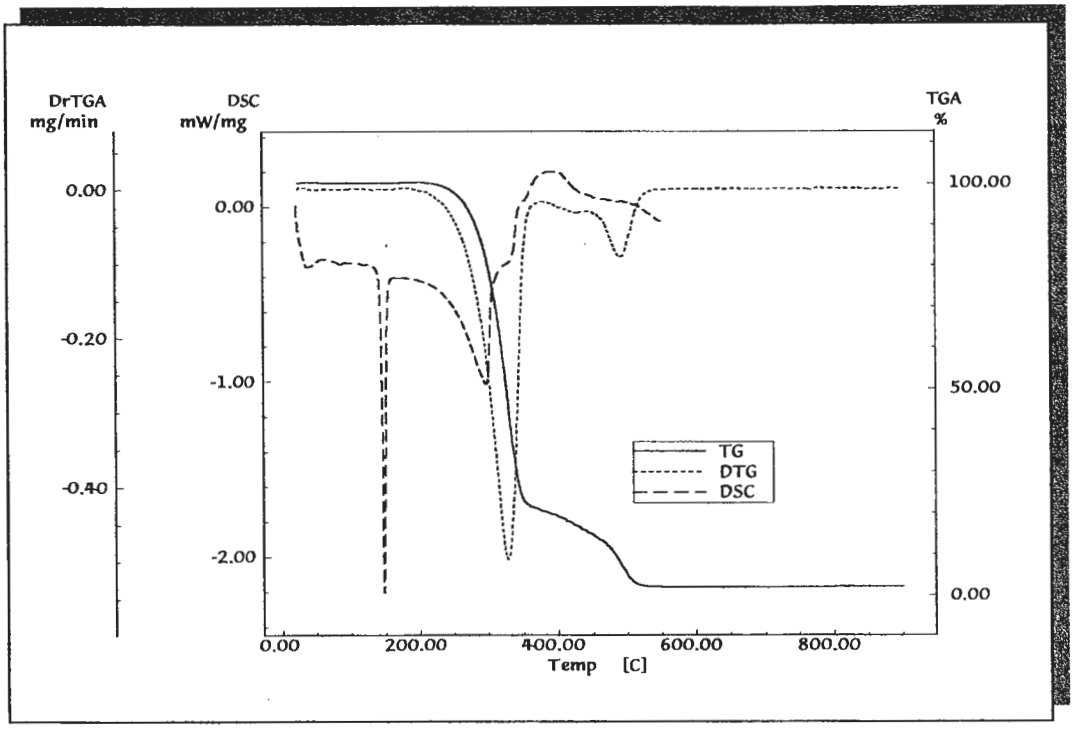

Figura IV.99 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF55

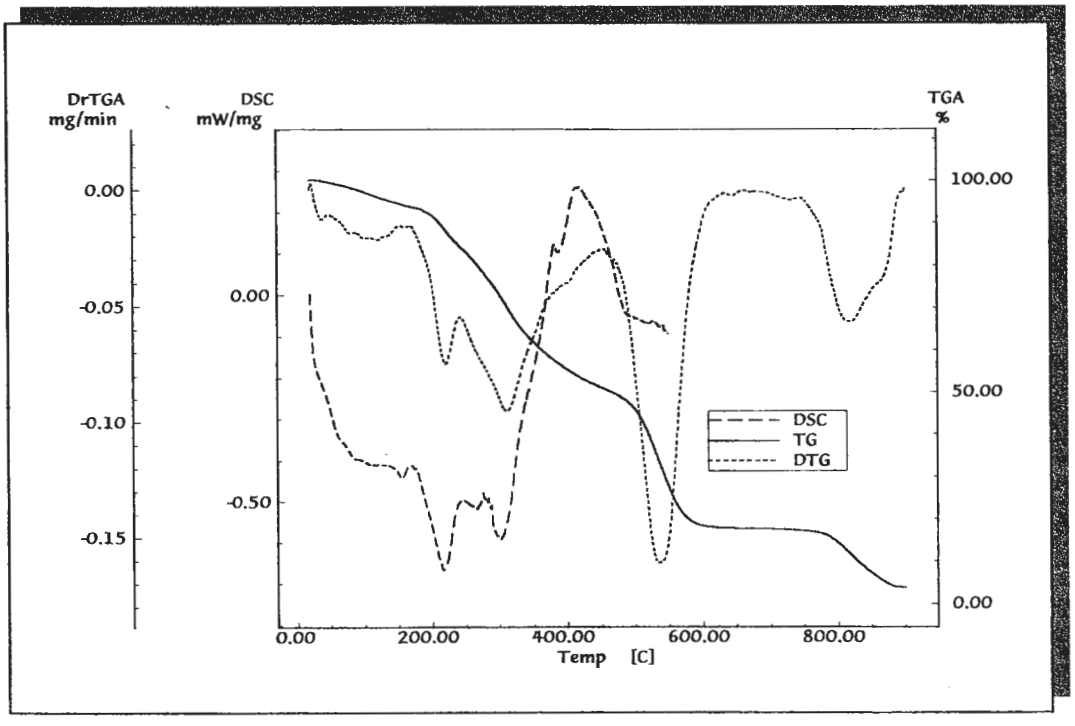

Figura IV.100 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF55

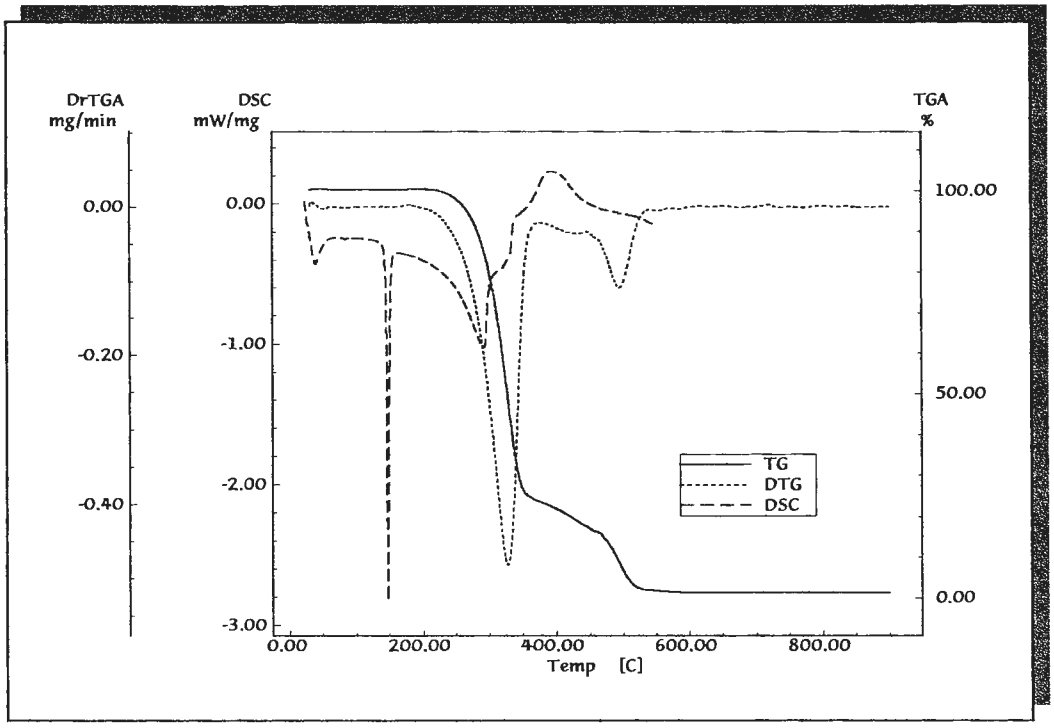

Figura IV.101 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF57

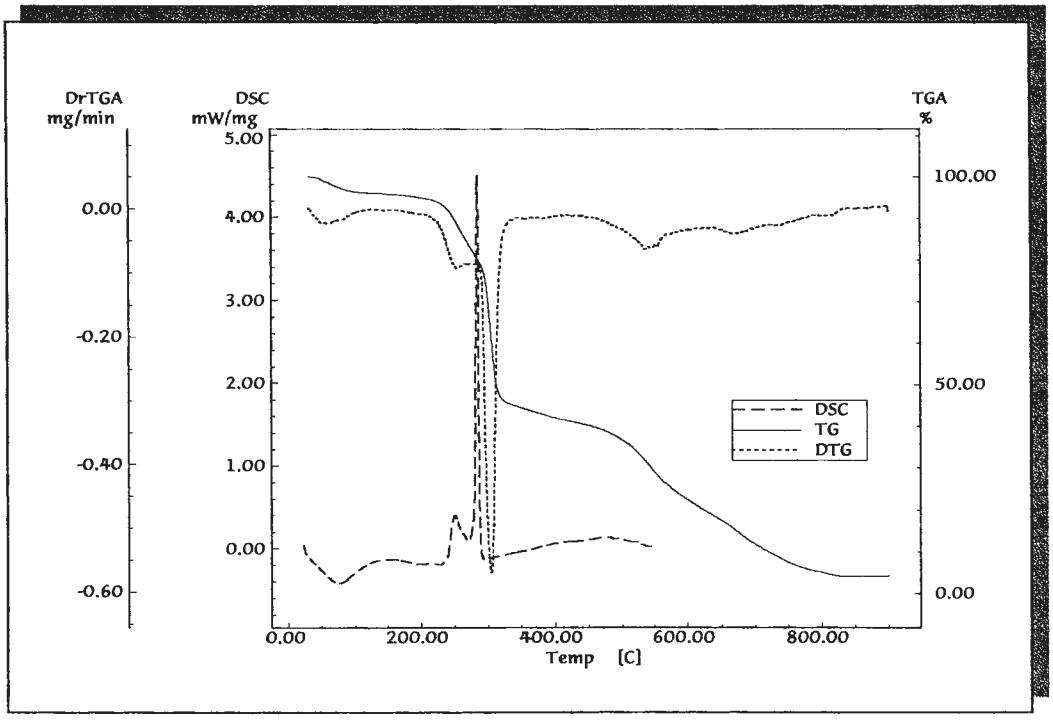

Figura IV. 102 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF57

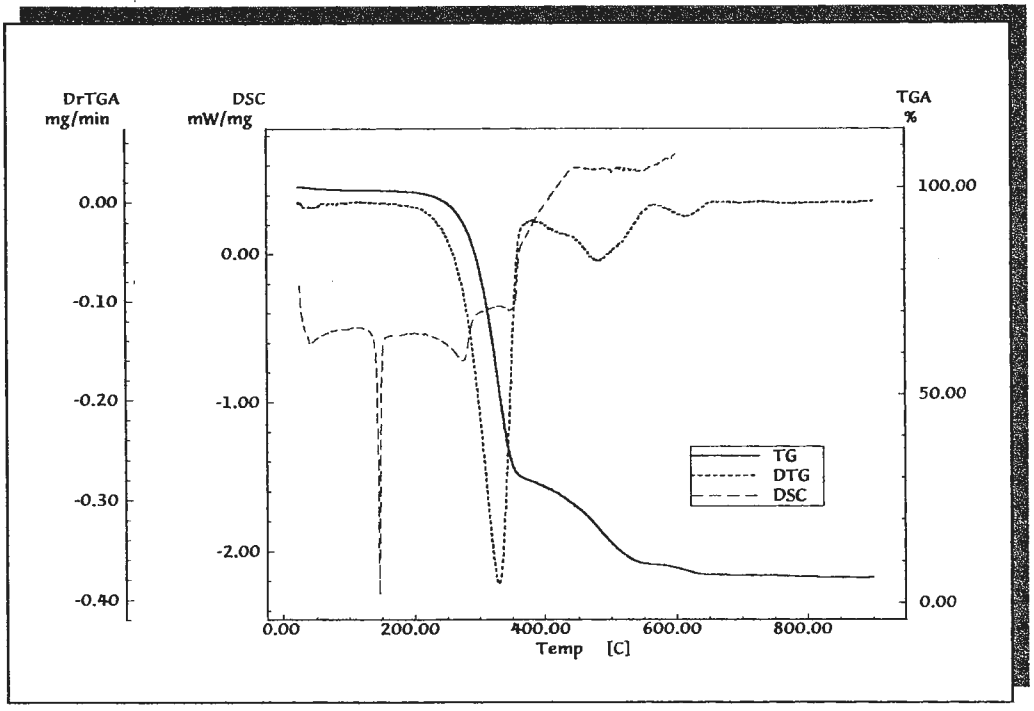

Figura IV.106 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF1

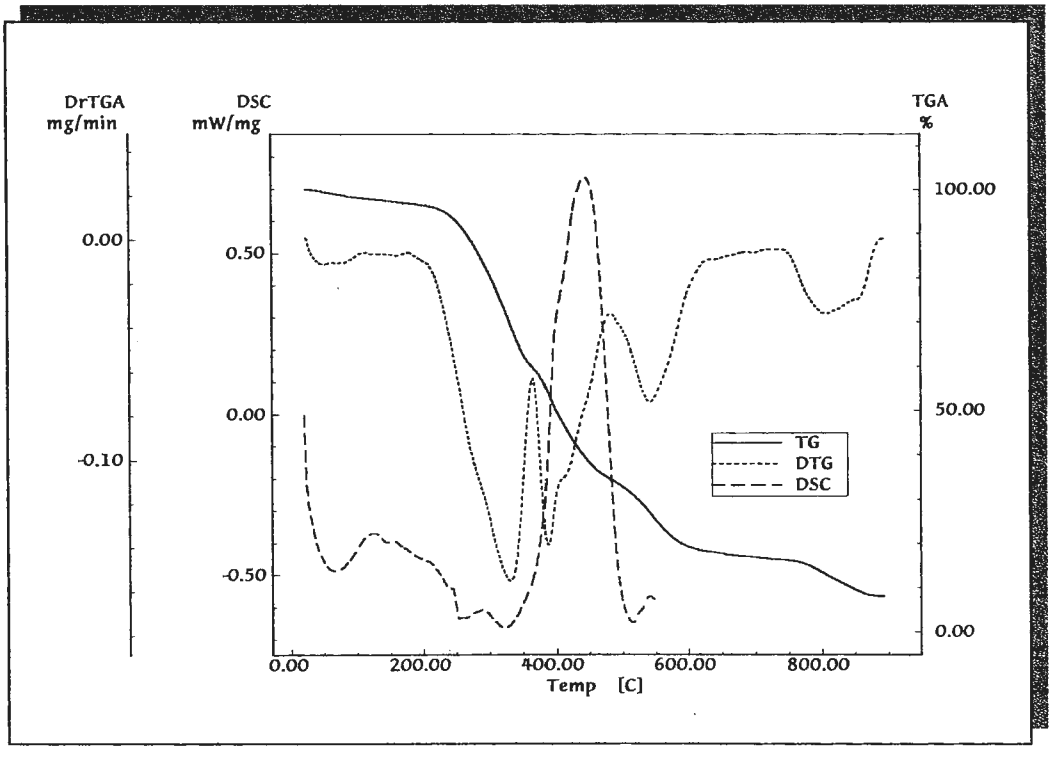

Figura IV.107 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF1

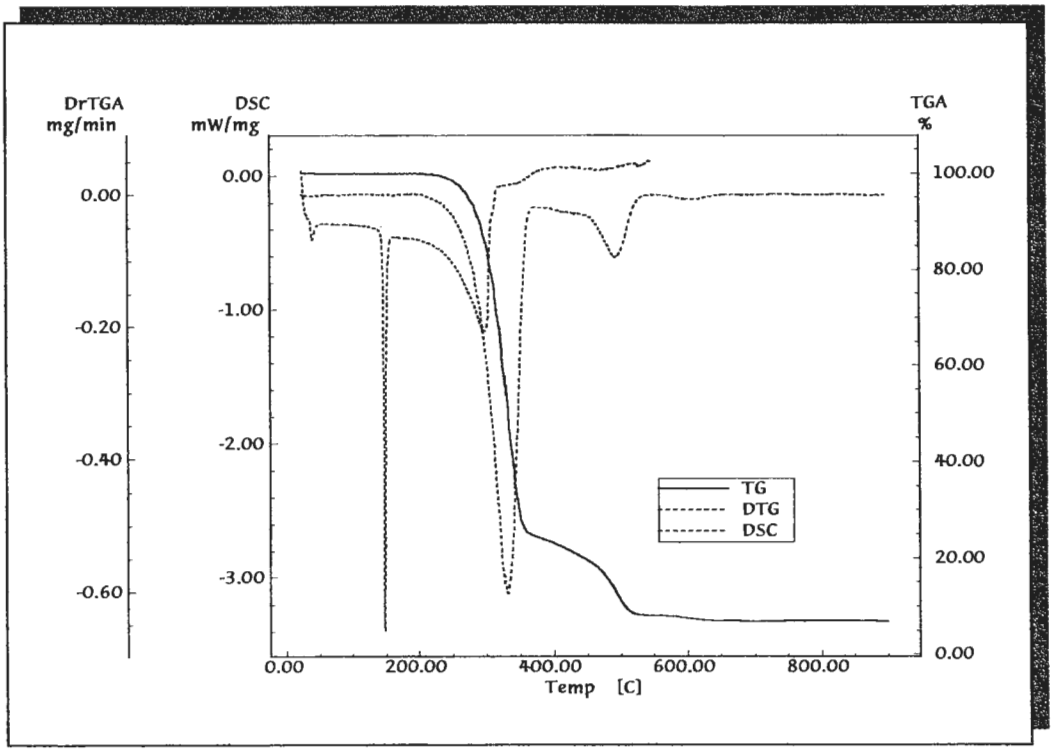

Figura IV.108 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF5

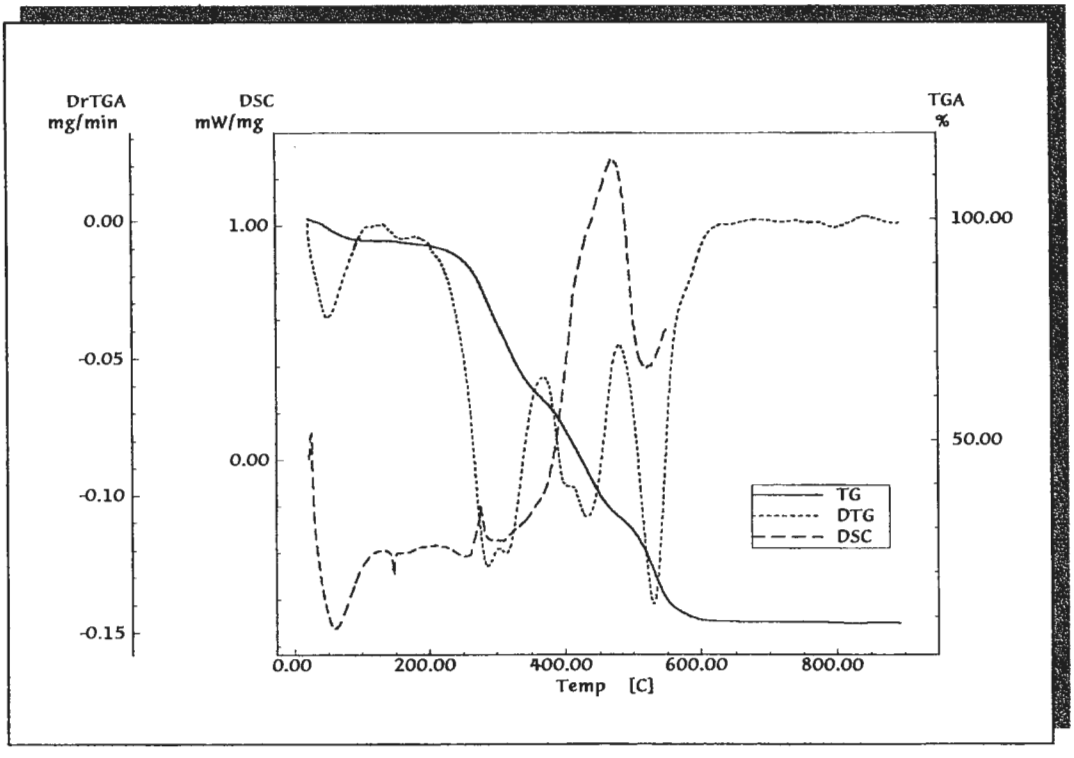

Figura IV.109- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF5

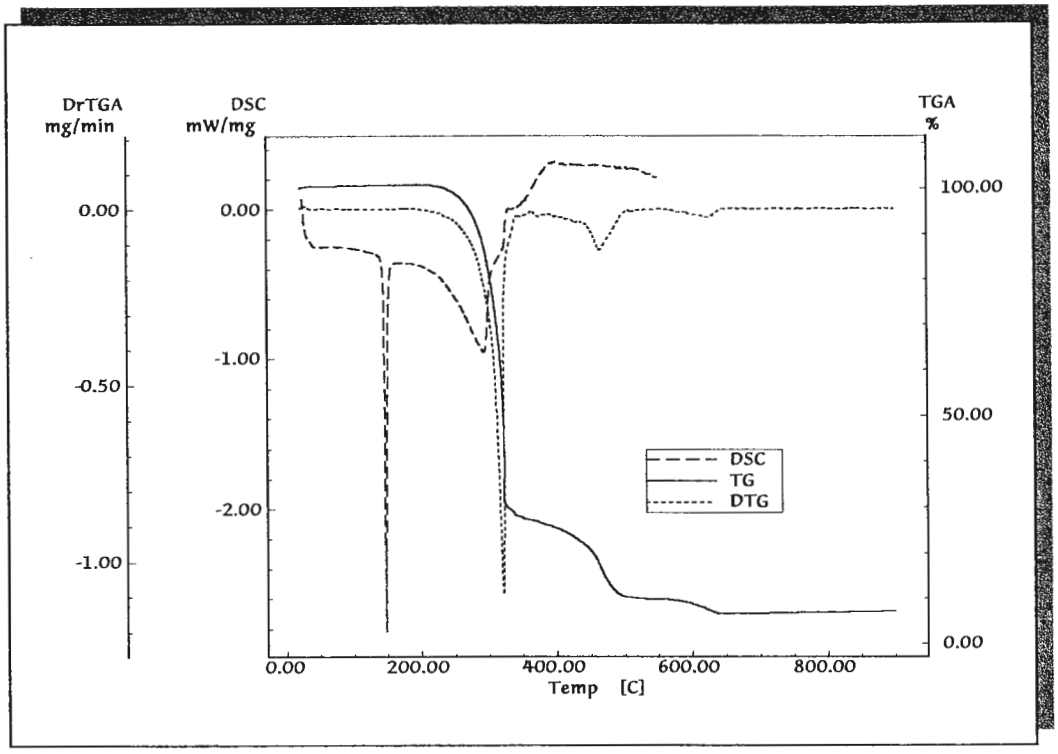

Figura IV.110 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM22

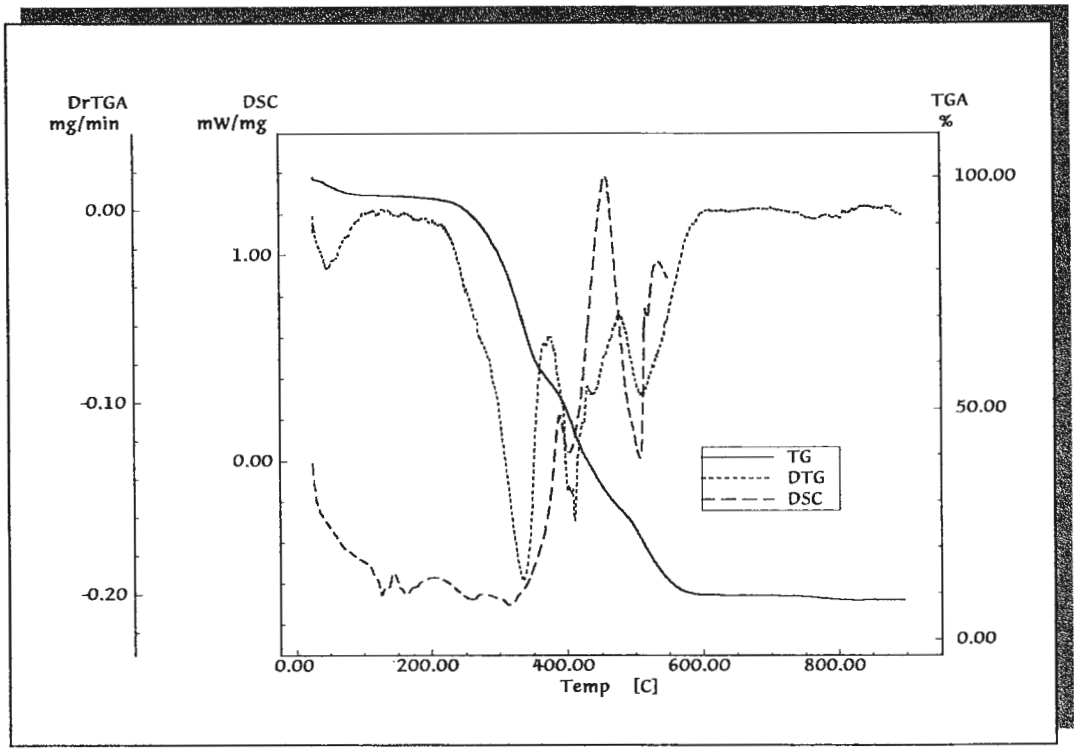

Figura IV.111 -- Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM22

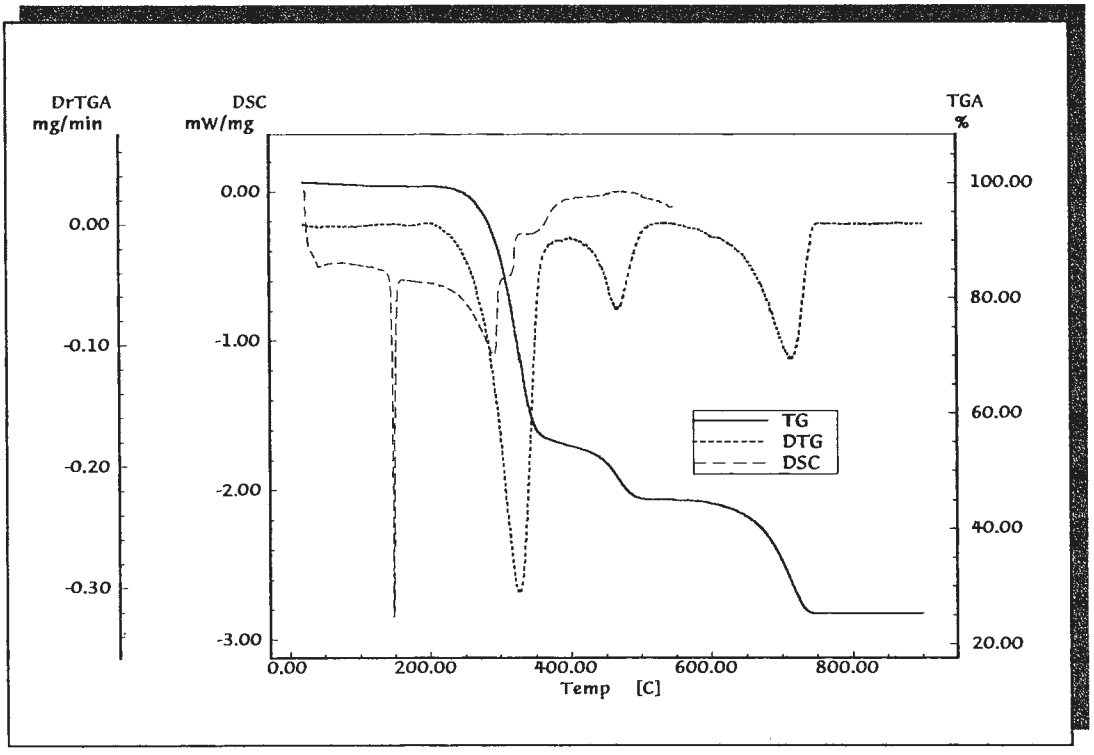

Figura IV. 112 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF25

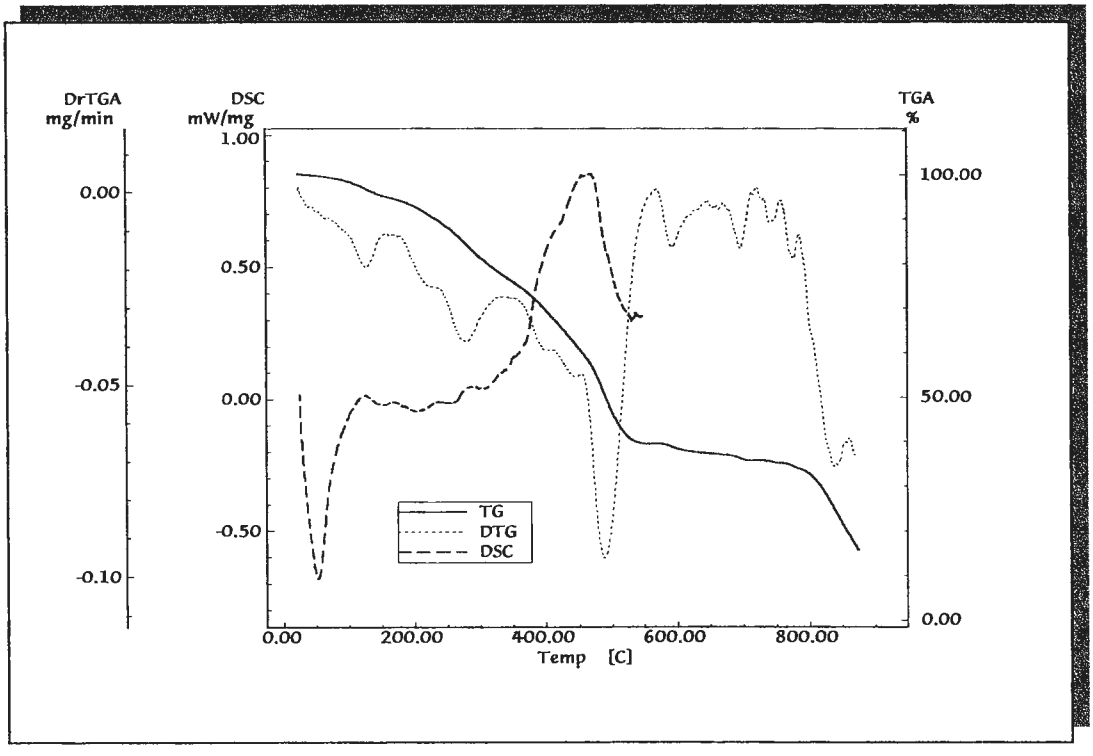

Figura IV.113 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF25

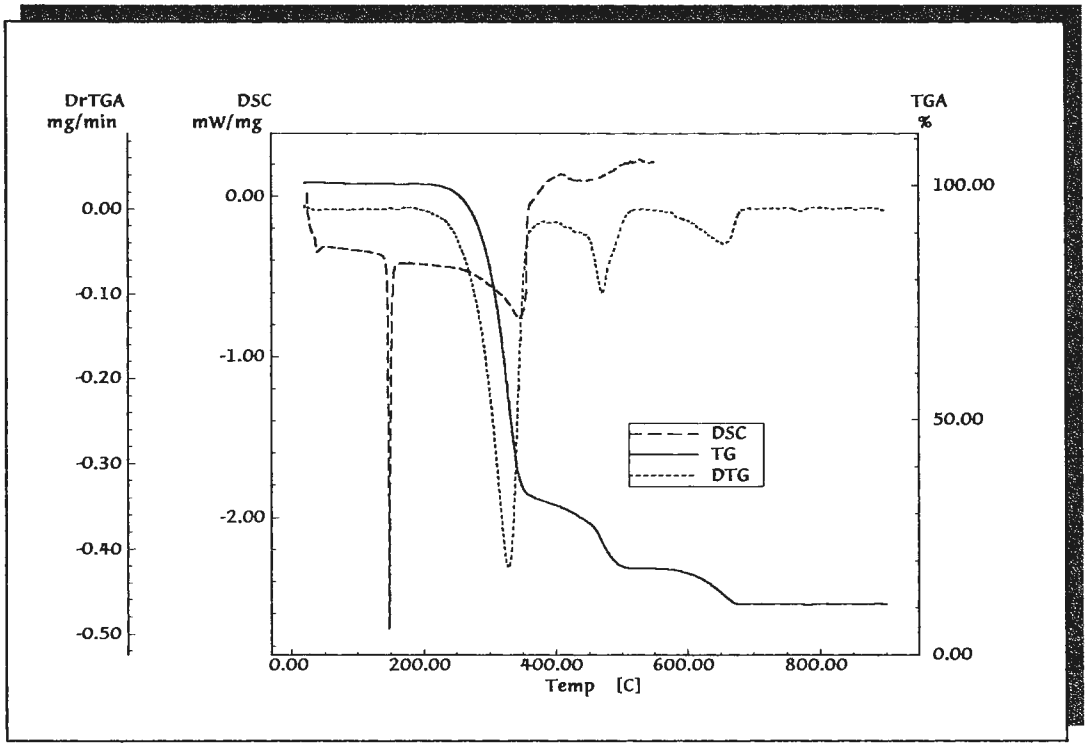

Figura IV.114 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF35

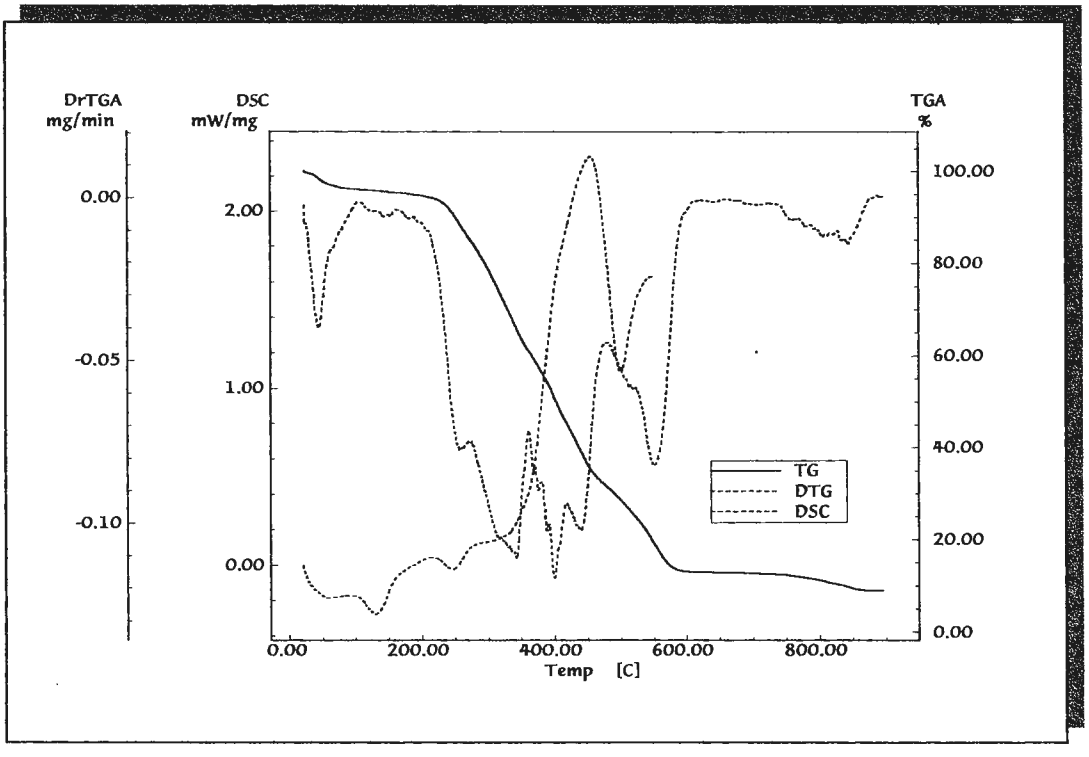

Figura IV.115 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF35

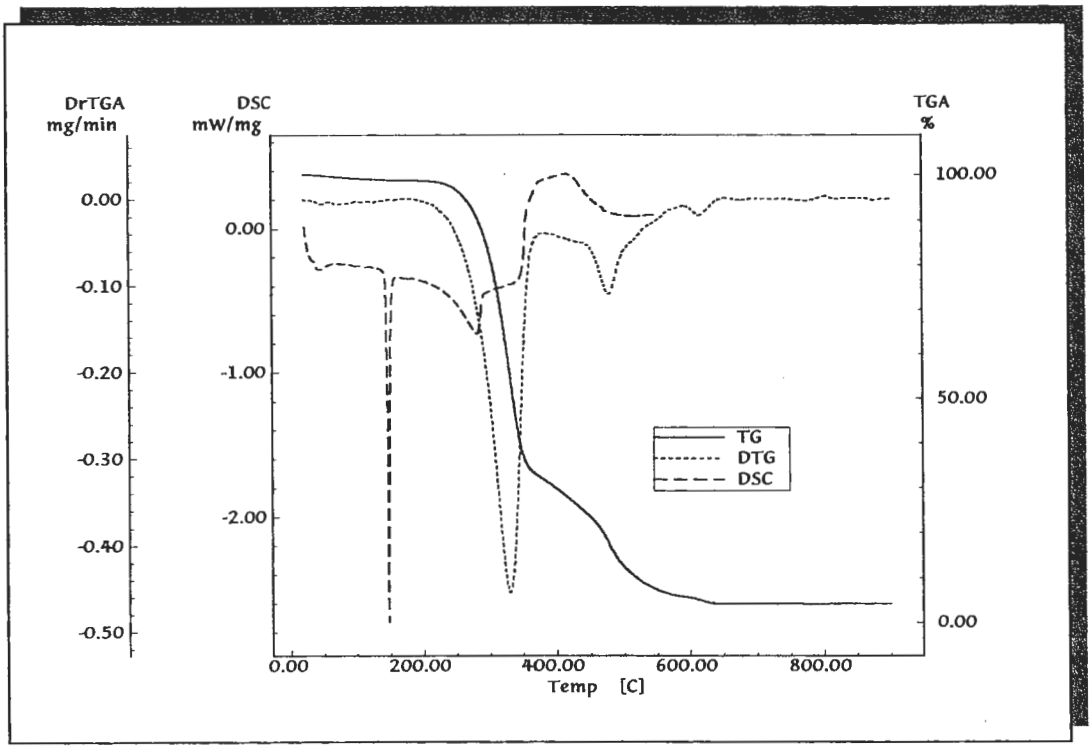

Figura IV.116 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM51

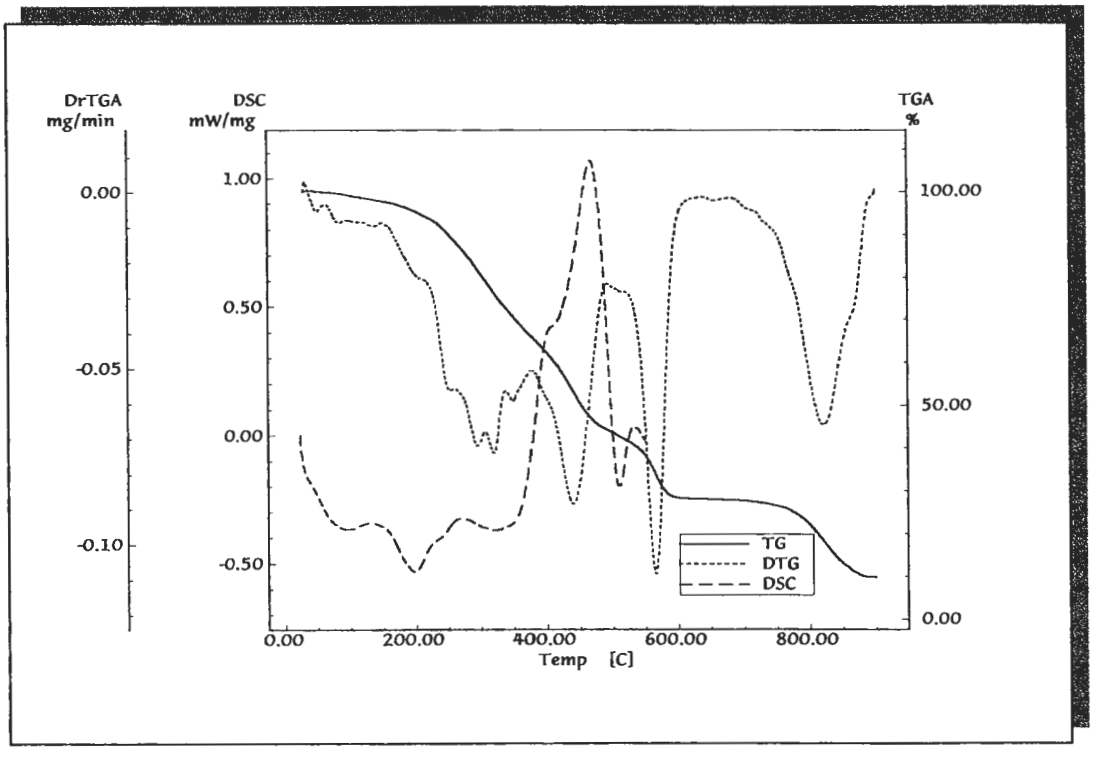

Figura IV.117 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM51

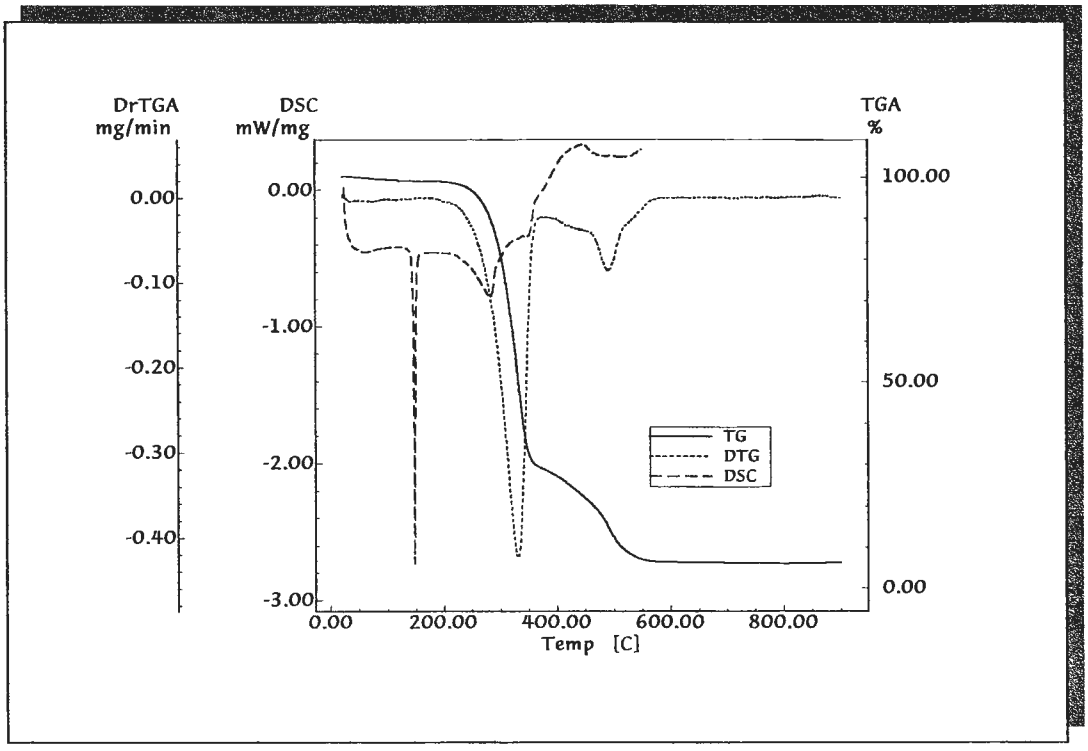

Figura IV.121 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF37

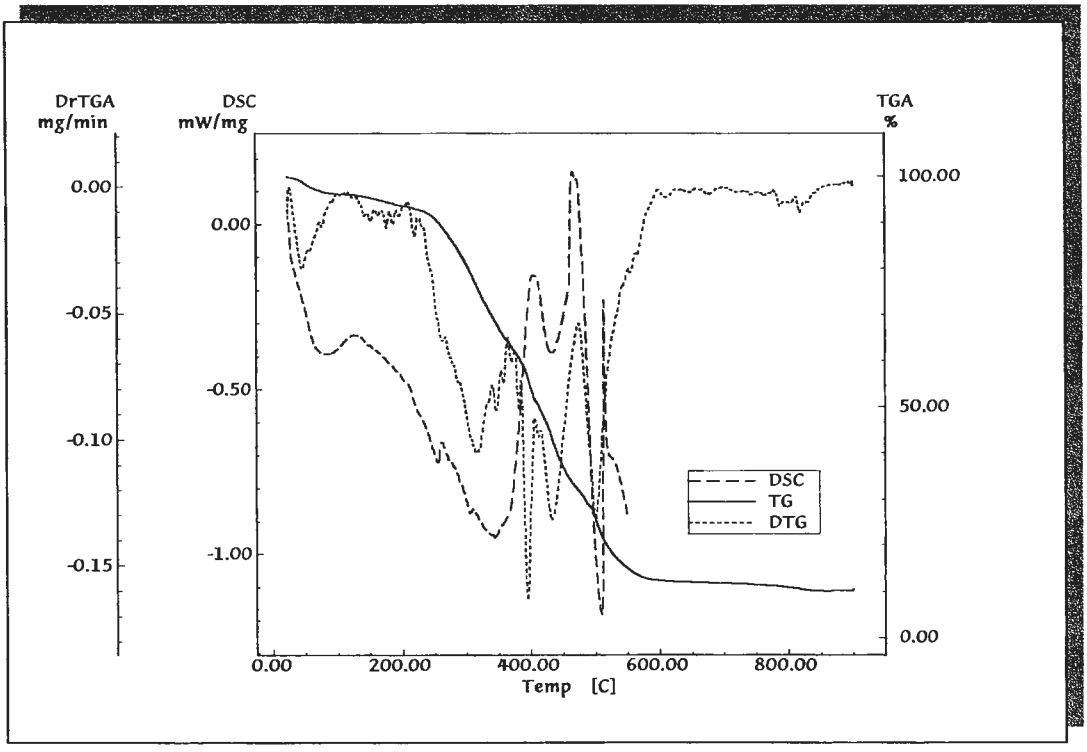

Figura IV.122 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF37

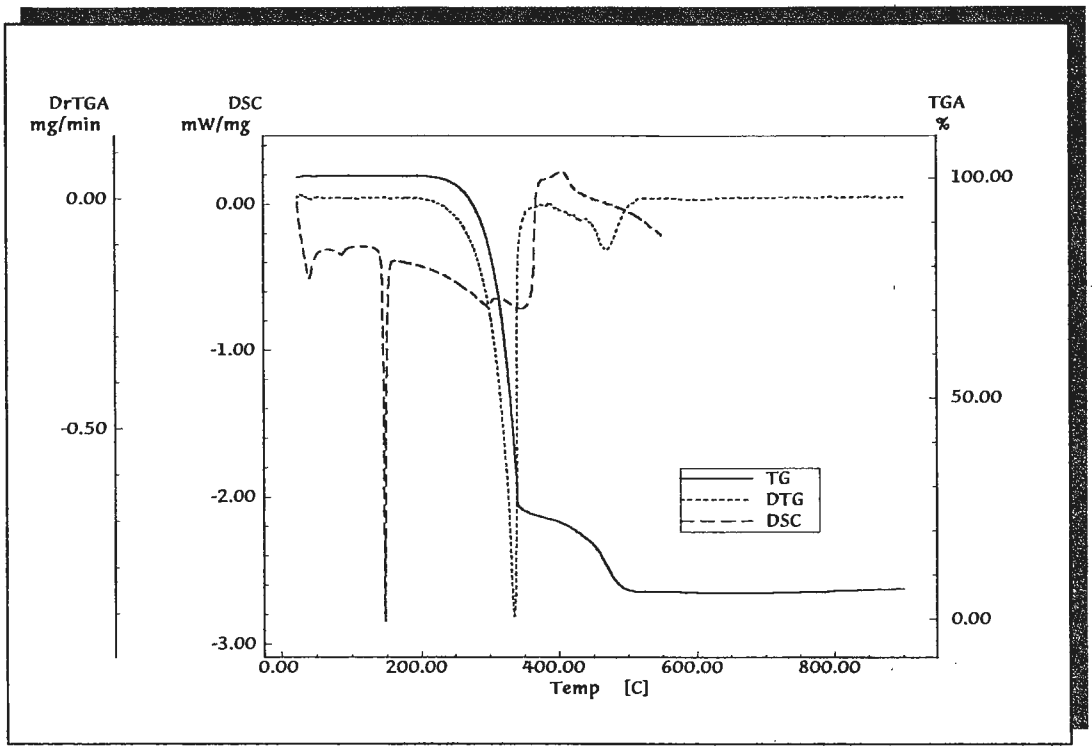

Figura IV.123 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SF59

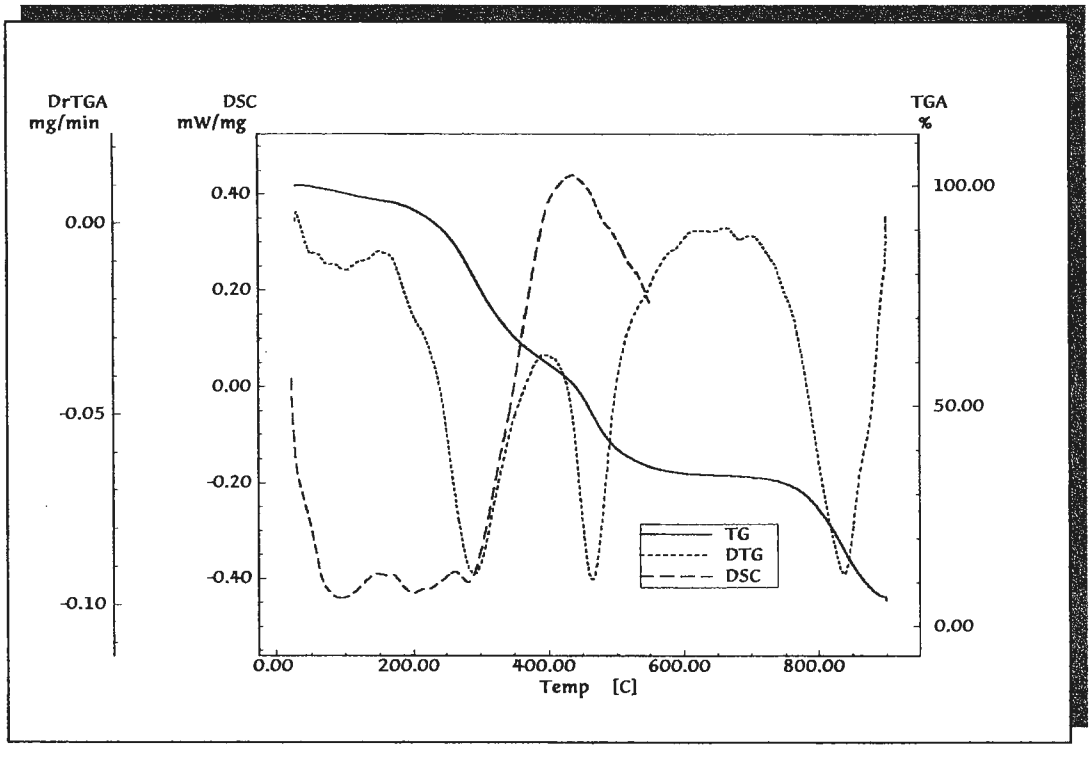

Figura IV.124 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BF59

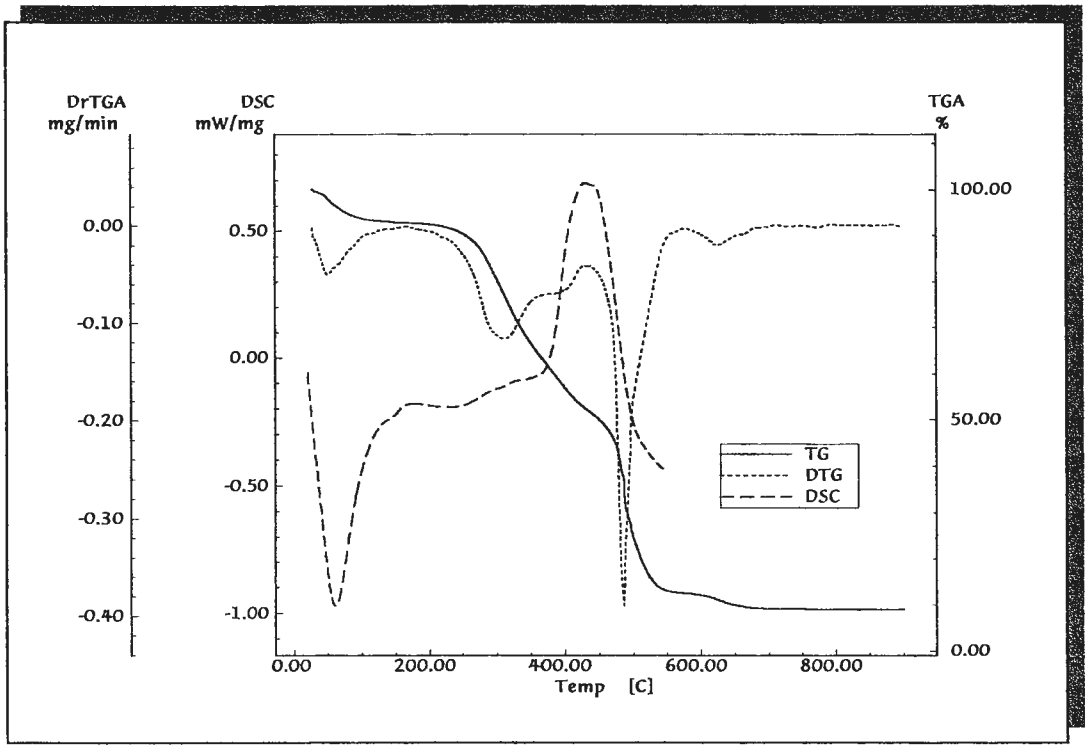

Figura IV.128 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM56

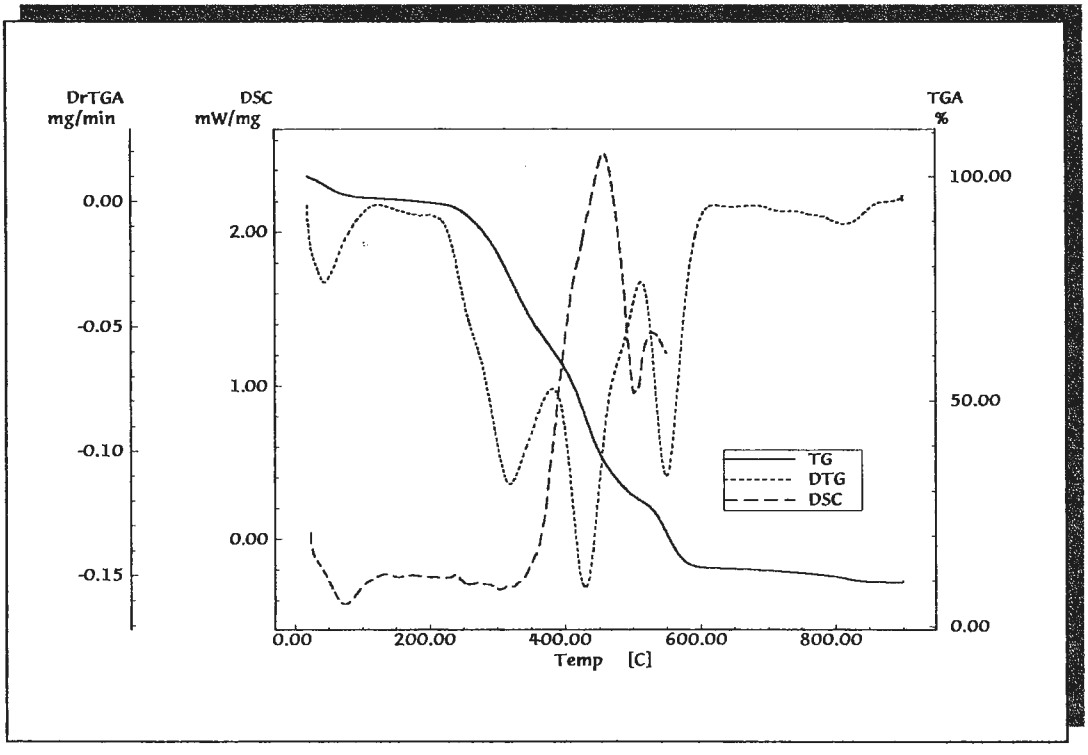

Figura IV.129 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM56

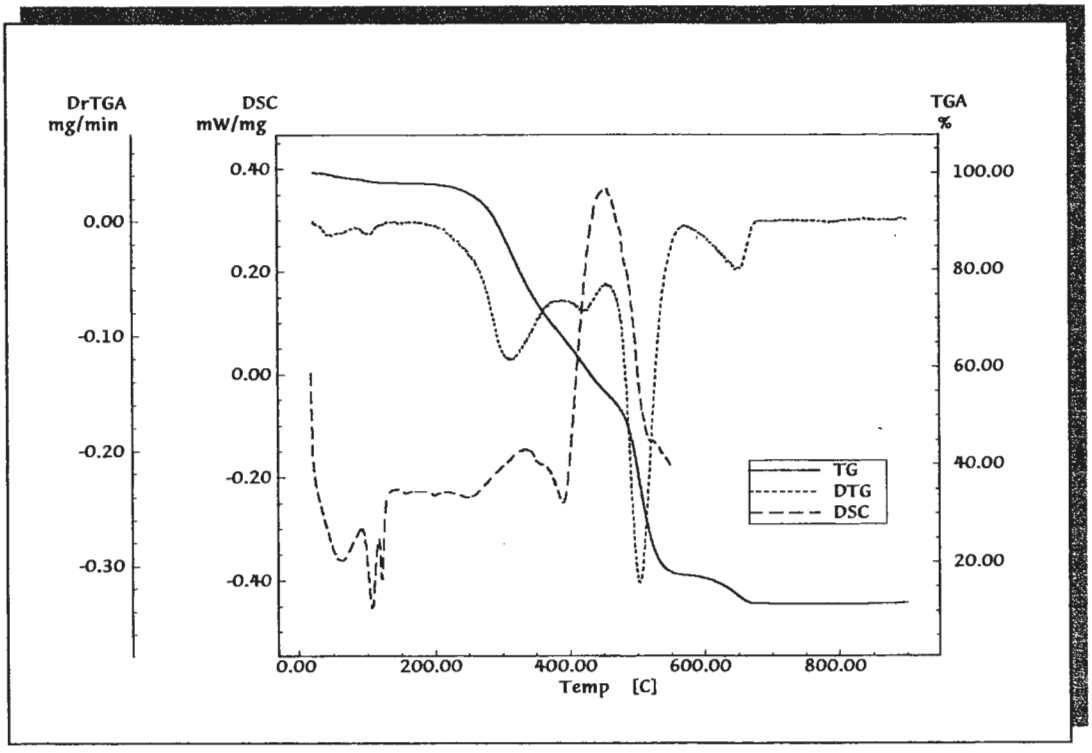

Figura IV.136 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de cálculo biliar SM43

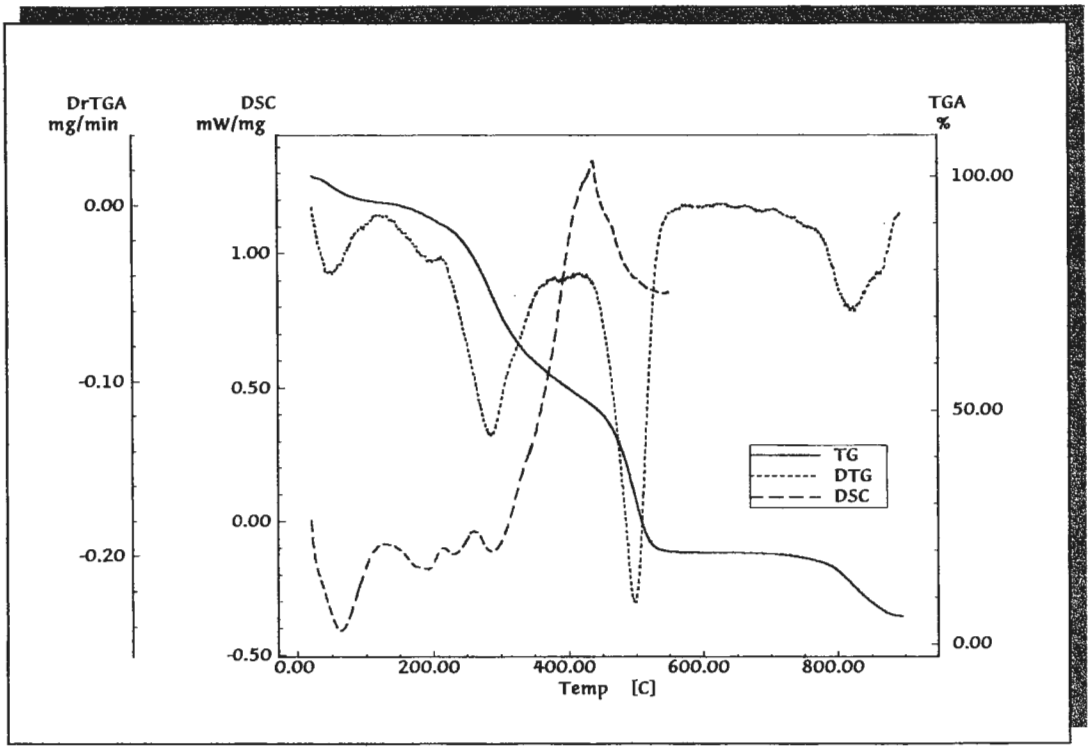

Figura IV.137 - Sobreposição das curvas TG/DTG e DSC da amostra de bile BM43