UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

JANAINA BASTOS DEPIANTI

BIOCRISTALOGRAFIA DE PEDRAS DE VESÍCULA

VITÓRIA 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

JANAINA BASTOS DEPIANTI

BIOCRISTALOGRAFIA DE PEDRAS DE VESÍCULA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu D'Azeredo Orlando.

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Belich Júnior.

VITÓRIA 2009 Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Depianti, Janaina Bastos, 1983-

D419b Biocristalografia de pedras de vesícula / Janaina Bastos Depianti. – 2009.

128 f.: il.

Orientador: Marcos Tadeu D'Azeredo Orlando.

Co-Orientador: Humberto Belich Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

Cristalografia de raio X. 2. Cálculos biliares. 3. Colesterol.
 Raios X - Difração. 5. Difração de pó. I. Orlando, Marcos
 Tadeu D'Azeredo. II. Belich Júnior, Humberto. III. Universidade
 Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. IV. Título.

CDU: 53



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

"Biocristalografia de Pedras de Vesícula"

Janaina Bastos Depianti

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada por:

Prof. Dr. Luis Gallego Martinez (IPEN)

Prof. Dr. Marcos Tadeu D'Azeredo Orlando (Orientador - UFES)

Prof. Dr. Humberto Belich Junior (Co-Orientador - UFES)

Prof. Dr. Flávio José da Silva (UFES)

Prof. Dr. José Maria Pires (UFES)

Vitória-ES, 28 de maio de 2009.

Dedicatória

Ao meu filho Mikael e ao meu esposo Erich, pela compreensão.
A minha família pelo incentivo.

Agradecimentos

Quero agradecer a Capes, pelo apoio financeiro, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron e o Laboratório de Caracterização dos Materiais (LCSM) pelo uso de suas instalações.

Gostaria de agradecer especialmente:

Ao Dr. Marcos Tadeu D'Azeredo Orlando pela orientação e incentivo.

Ao Dr. Humberto Belich Júnior pela orientação.

Ao Dr. Flávio José da Silva pela importante colaboração com o trabalho.

Aos colegas do grupo pelo apoio.

Resumo

A litíase biliar é caracterizada pela presença de pedras na vesícula biliar. A litíase é considerada a afecção mais frequente do trato biliar. Aproximadamente 95% dos distúrbios do trato biliar são atribuídos a ela. Considerando a importância deste problema, os objetivos deste trabalho foram: a) descrever a biocristalografia e, em específico, determinar a composição de 49 amostras de pedras de vesícula coletadas de doadores de ambos os sexos residentes no Estado do Espírito Santo; b) propor uma classificação morfológica para essas pedras.

Os resultados indicam que a litíase biliar, no Estado do Espírito Santo, tem uma prevalência maior em mulheres, pois das 49 amostras coletadas, 84% foram de doadores do sexo feminino. Além disso, a classificação morfológica indicou a presença de três grupos distintos: oval, geométrica e irregular. Das amostras coletadas 63% das pedras foram classificadas como ovais 25% como geométricas e 12% como pedras irregulares.

A análise preliminar da composição das amostras, através de medidas de difração de raios X por pó, identificou o colesterol como fase majoritária nas amostras. O refinamento CELREF dos parâmetros de rede da estrutura cristalina do colesterol presente nas amostras mostrou valores próximos aos fornecidos pelo padrão do colesterol. Utilizando a difração de raios X por pó em conjunto com a técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), possibilitou determinar exatamente os compostos das amostras analisadas, além do colesterol foram encontrados o acetato de ergosterol, o 1,3-Bis(4-fenoxibezil) benzeno, o bilirrubinato de cálcio, a bilirrubina, o fosfato de cálcio, o carbonato de cálcio e o palmitato de cálcio.

As análises das medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram que as pedras classificadas como geométricas possuem anéis concêntricos, de fases diferentes, ao redor do seu centro, podendo ser um indicativo de que esse tipo de pedra tenha um crescimento diferente das pedras ovais e irregulares.

Abstract

The presence of stones into the gallbladder, so called gallstone, is considered the most common disorder of the biliary tract. Indeed gallstones have been responsible for 95% of biliary tract disorders. Therefore analytical study of the gallstones has been very important to develop efficient clinical treatments. In this work it was studied the biocristalography and the composition of 49 gallbladder stones collected from both sexes' donors of the State of Espírito Santo, Brazil. Furthermore, this work proposes a morphological classification of these stones.

Our results indicated that in the state of Espírito Santo the gallstone disease has higher prevalence among women because, since 84% of 49 samples donors were female. Furthermore, the morphological classification indicated the presence of three distinct groups: oval, geometric and irregular. Of the samples collected 63% of stones were classified as oval as 25% and 12% as geometric irregular stones.

Preliminary analysis of composition by X-ray powder diffraction, identified cholesterol as the major phase in the samples. CELREF The refinement of the network parameters of the crystalline structure of cholesterol present in the samples showed values close to those provided by standard cholesterol. Using the X-ray diffraction by powder in combination with energy dispersive spectroscopy (EDS), has determined exactly the compounds of the samples analyzed, in addition to cholesterol were found to ergosterol acetate, the 1,3-Bis (4-phenoxybenzoyl) Benzene, the calcium bilirrubinate, the bilirubin, the calcium phosphate, calcium carbonate, calcium palmitate.

The Scanning Electron Microscopy (SEM) measurements indicated that compared with the oval and irregular stones, that so classified as geometrical, grew in a different way. This may have occurred due to the concentric rings of different phases, observed around the center of these samples.

Lista de Ilustrações

Figura 2.1 - Desenho esquemático das vias biliares (DÂNGELO; FATTINI 2002). 10
Figura 2.2- Vista esquemática da vesícula biliar e ductos bilíferos. As partes
anteriores da vesícula biliar, dos ductos bilíferos e do duodeno foram removidas para
expor a túnica mucosa (modificada de SOBOTTA, 2000) 12
Figura 2.3 - Representação esquemática dos quatro fatores que contribuem para a
litíase biliar: supersaturação, hipomotilidade da vesícula biliar, nucleação de cristais
e acréscimo por justaposição dentro da camada de muco na vesícula biliar
(CROWFORD, 2000) 17
Figura 2.4 - Desenho esquemático das complicações causadas pela litíase biliar. 19
Figura 3.1 - O espectro contínuo de raios X que é emitido de um alvo de tungstênio,
para quatro diferentes valores de energia dos elétrons incidentes (EISBERG;
RESNIK, 1979) 23
Figura 3.2 - Um espectro de Raios X típico. As linhas são características dos átomos
do anodo do tubo de raios X (tungstênio no caso acima). O continum provém do
bremmstrahlung produzido pelos elétrons acelerados no espalhamento com a
eletrosfera desses átomos (EISBERG; RESNIK, 1974) 24
Figura 3.3 - A luz emitida pela deflexão do feixe nos dipolos é emitida na direção
tangencial à trajetória descrita pelas partículas, formando um leque. Dessa luz
emitida, uma parte é retirada para ser aproveitada como instrumento de prova em
uma série de experiências (PASSAMAI, 2005) 26
Figura 3.4 - Difração de Bragg para dois planos paralelos (TIPLER;
LLEWELLYN,1978)28
Figura 3.5 - Esquema ilustrativo da construção de um sólido 29
Figura 3.6 - Redes de Bravais em 3D 32
Figura 3.7 - Estratégias de identificação de fases por natureza de composto e pelo
método Hanawalt (KAHN, 2007) 35
Figura 4.1 - Funcionamento do microscópio óptico e do microscópio eletrônico de
varradura (DEDAVID: COMES: MACHADO, 2007)

Figura 4.2 - Volume de interação: a) localização dos sinais emitidos pela amostra; b
relação da voltagem para elementos leves e pesados. Figura adaptada de
KASTEMBACK, 1994 4
Figura 4.3 - Esquema ilustrativo da emissão de raios X. Adaptado de
KASTENBACH, 199445
Figura 4.4 - Espectro obtido por microanálise de raios X característicos por EDS con
tabela de discriminação dos elementos analisados (DEDAVID; GOMES; MACHADO
2007)
Figura 5.1- Linha de luz XPD (FERREIRA et al.,2006) 53
Figura 6.1 - Percentual das classes das amostras 58
Figura 6.2 - Evolução do parâmetro de rede a6
Figura 6.3 - Evolução do parâmetro de rede b6
Figura 6.4 - Evolução do parâmetro de rede c62
Figura 6.5 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V16 62
Figura 6.6 - Imagem da topografia da amostra V16 (fraturada) ampliada 25 vezes
obtida através de MEV utilizando o sinal SE63
Figura 6.7- Imagem obtida da topografia da amostra V16 (fraturada) ampliada 600
vezes através de MEV utilizando o sinal BSD63
Figura 6.8 - Imagem da amostra V16 (fraturada) ampliada 2000 vezes mostrando
um contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV com o sina
BSD64
Figura 6.9 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura
6.86
Figura 6.10 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na
Figura 6.8 65
Figura 6.11 – Imagem da amostra V16 (polida) ampliada 50 vezes obtida com MEN
utilizando o sinal BSD66
Figura 6.12 – Padrão de difração obtido para a amostra V16 utilizando a técnica de
difração de raios X por pó67
Figura 6.13 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V40 67
Figura 6.14 - Imagem da amostra V40 (polida) ampliada 100 vezes obtida com ME\

Figura 6.15- Imagem da amostra V40 (polida) ampliada 1500 vezes mostrando u
contraste de composição nos pontos 1, 2, 3 e 4 obtida através do MEV com o sir
BSD
Figura 6.16 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado i
Figura 6.15 (
Figura 6.17 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado i
Figura 6.15 (
Figura 6.18 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado i
Figura 6.15
Figura 6.19 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 4 mostrado l
Figura 6.15
Figura 6.20 - Padrão de difração obtido para a amostra V40 utilizando a técnica o
difração de raios X por pó
Figura 6.21 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V41
Figura 6.22 - Imagem da amostra V41 (polida) ampliada 100 vezes obtida com ME
utilizando o sinal BSD
Figura 6.23 - Imagem da amostra V41 (polida) ampliada 100 vezes mostrando u
contraste de composição nos pontos 1, 2 e 3 obtida através do MEV com o sir
BSD
Figura 6.24 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado i
Figura 6.23
Figura 6.25 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado i
Figura 6.23
Figura 6.26 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado i
Figura 6.23
Figura 6.27 - Imagem da amostra V41 (polida) ampliada 1000 vezes mostrando u
contraste de composição nos pontos 1, 2 e 3 obtida através do MEV com o sir
BSD
Figura 6.28 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado i
Figura 6.27 :
Figura 6.29 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado i
Figura 6.27
Figura 6.30 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado i
Figura 6.27.

Figura 6.31 - Padrão de difração obtido para a amostra V41-01 (pô) utilizando a
técnica de difração de raios X por pó 78
Figura 6.32 - Padrão de difração obtido para a amostra V41-02 (interior) utilizando a
técnica de difração de raios X por pó78
Figura 6.33- Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V45 79
Figura 6.34 - Imagem da amostra V45-01 (polida) ampliada 53 vezes obtida com
MEV utilizando o sinal BSD
Figura 6.35 - Imagem da amostra V45-01 (polida) ampliada 1000 vezes mostrando
um contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV com o sinal
BSD80
Figura 6.36 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na
Figura 6.35 80
Figura 6.37 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na
Figura 6.35 81
Figura 6.38 - Padrão de difração obtido para a amostra V45-01 utilizando a técnica
de difração de raios X por pó82
Figura 6.39 - Padrão de difração obtido para a amostra V45-02 utilizando a técnica
de difração de raios X por pó82
Figura 6.40 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V38 83
Figura 6.41 - Imagem obtida da amostra V38 (polida) aumentada 58 vezes através
de MEV utilizando o sinal BSD83
Figura 6.42 - Imagem da região do centro da amostra V38 (polida) ampliada 450
vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1, 2, 3 4 e 5 obtida
através do MEV com o sinal BSD84
Figura 6.43 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na
Figura 6.42 84
Figura 6.44 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na
Figura 6.42 85
Figura 6.45 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado na
Figura 6.42 85
Figura 6.46 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 4 mostrado na
Figura 6.42 86
Figura 6.47 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 5 mostrado na
Figura 6.42. 86

Figura 6.48 - Imagem da borda da amostra V38 (polida) ampliada 400 vezes
mostrando um contraste de composição nos pontos 1, 2, 3, 4 , 5 e 6 obtida através
do MEV com o sinal BSD 87
Figura 6.49 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na
Figura 6.48 88
Figura 6.50 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na
Figura 6.48 88
Figura 6.51 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado na
Figura 6.48 89
Figura 6.52 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 4 mostrado na
Figura 6.48 89
Figura 6.53 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 5 mostrado na
Figura 6.48 90
Figura 6.54 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 6 mostrado na
Figura 6.48 90
Figura 6.55 - Padrão de difração obtido para a amostra V38-01 utilizando a técnica
de difração de raios X por pó 91
Figura 6.56 - Padrão de difração obtido para a amostra V38-02 utilizando a técnica
de difração de raios X por pó92
Figura 6.57 - Padrão de difração obtido para a amostra V38-03 utilizando a técnica
de difração de raios X por pó 92
Figura 6.58 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V43 93
Figura 6.59 - Imagem da borda da amostra V43 (polida) aumentada 50 vezes obtida
através de MEV utilizando o sinal BSD93
Figura 6.60 - Imagem dual obtida da amostra V43 (polida) aumentada 50 vezes
obtida através de MEV utilizando o sinal BSD 94
Figura 6.61 - Imagem da borda da amostra V43 (polida) ampliada 100 vezes
mostrando um contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV
com o sinal BSD94
Figura 6.62 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na
Figura 6.61 95
Figura 6.63 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na
Figura 6.61 95

Figura 6.64 - Padrão de difração obtido para a amostra V43 utilizando a técnica d	le
difração de raios X por pó 9	96
Figura 6.65 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V54 9	7
Figura 6.66 - Imagem da amostra V54 (polida) aumentada 100 vezes obtida atravé	કંડ
de MEV utilizando o sinal BSD9	7
Figura 6.67 - Imagem da amostra V54 (polida) ampliada 400 vezes mostrando un	m
contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV com o sinal BSL).
9	8
Figura 6.68 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado n	ıa
Figura 6.67 9	8
Figura 6.69 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado n	ıa
Figura 6.67 9	9
Figura 6.70 - Padrão de difração obtido para a amostra V54 utilizando a técnica d	le
difração de raios X por pó 10	10
Figura 6.71 - Sexo dos doadores.)2

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Prevalência da litíase biliar (modificada de SHAFFER, 2006)	2
Tabela 2.1 – Composição da bile hepática humana (AIRES; SANIOTO, 1999)	_ 11
Tabela 2.2 - Composição da bile hepática e vesicular humana (AIRES; SANI	ото,
1999)	_ 13
Tabela 3.1- Radiação característica dos principais materiais utilizados em tubo	
raios X	_ 25
Tabela 3.2 - Classificação das estruturas cristalinas dentro dos sistemas crista	
	_ 31
Tabela 5.1 – Medidas realizadas no LNLS	
Tabela 6.1 - Classificação das amostras de acordo com a morfologia.	_ 57
Tabela 6.2 - Porcentagem de fase.	_ 58
Tabela 6.3 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V16 refe	
aos pontos 1 e 2 da Figura 6.8	_ 65
Tabela 6.4 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V40 refe	rente
aos pontos 1, 2, 3 e 4 da Figura 6.15	_ 71
Tabela 6.5 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V41 refe	rente
aos pontos 1, 2 e 3 da Figura 6.23	_ 75
Tabela 6.6 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V41 refe	
aos pontos 1, 2 e 3 da Figura 6.27	_ 77
Tabela 6.7 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V45-01 refe	rente
aos pontos 1 e 2 da Figura 6.35	_ 81
Tabela 6.8 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V38 (região	io do
centro) referente aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 da Figura 6.42	_ 87
Tabela 6.9 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V38 (região	ĭo da
borda) referente aos pontos 1, 2, 3, 4, 5 e da Figura 6.48	_ 91
Tabela 6.10 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V43 (região	ão da
borda) referente aos pontos 1 e 2 da Figura 6.61	_ 96
Tabela 6.11 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V54 refe	rente
aos pontos 1 e 2 da Figura 6.67	99

Tabela	6.12	-	Porcentagem	de	fase	е	elementos	químicos	encontrados	nas
amostra	ns									101

Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Ilustrações	viii
Lista de Tabelas	xiv
Sumário	xvi
Capítulo 1	1
1. Introdução	1
Referências do Capítulo 1	6
Capítulo 2	9
2. A Árvore Biliar	9
2.1. Funções da Árvore Biliar	9
2.1.1. Secreção Biliar	
2.2. Função dos Sais Biliares na Digestão e Absorção de Gorduras	s 14
2.3. Litíase Biliar	15
2.3.1. Formação dos Cálculos de Colesterol	16
2.3.2. Cálculos Pigmentares	18
2.3.3. Manifestações Clínicas Devido aos Cálculos Biliares	18
2.3.4. Outros Métodos de Classificação dos Cálculos Biliares	19
Referências do Capítulo 2	21
Capítulo 3	22
3. Difração de Raios X	22
3.1. Histórico	22
3.2. Produção de Raios X	23
3.3. Radiação Síncrotron	25

3.3.1. Detalhes do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)	_ 27
3.4. Difração de Raios X e a Lei de Bragg	_ 28
3.5. Estrutura Cristalina	_ 29
3.5.1. Rede de Bravais	
3.6. Método do Pó	_ 33
3.7. Avaliação do Padrão Obtido Através de Medidas de Difração de raio	s X
por pó	_ 34
3.7.1. Identificação das Fases	
3.7.2. Avaliação das Fases	_ 36
3.7.3. Avaliação dos Parâmetros de Rede do Cristal	_ 36
Referências do Capítulo 3	_ 38
Capítulo 4	_ 40
4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	_ 40
4.1. Princípio de Funcionamento do MEV	_ 40
4.1.1. Elétrons Secundários (SE)	_ 42
4.1.2. Elétrons Retroespalhados (BSE)	_ 43
4.2. Microanálise de Raios X	_ 44
4.2.1. Aspectos Quantitativos	
4.3. Preparação das Amostras para a Medida de MEV	_ 47
Referências do Capítulo 4	_ 49
Capítulo 5	_ 50
5. Metodologia Experimental	_ 50
5.1. Coleta e Registro das Amostras	_ 50
5.2. Preparação das Amostras e Medidas de Difração de raios X por Pó	_ 51
5.3. Identificação e Avaliação das Fases através das Medidas de Difraçã	0
de Raios X por Pó	_ 54
5.4. Refinamento dos Parâmetros de Rede	_ 54
5.5. Preparação e Medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura	54

Referências do Capítulo 5	56
Capítulo 6	57
6. Resultados	57
Capítulo 7	103
7. Conclusões	103
Sugestões para Trabalhos Futuros	105
Glossário	106

Capítulo 1

Introdução

A litíase biliar, também conhecida como colelitíase, é caracterizada pela presença de pedras (ou cálculos) na vesícula biliar e constitui uma das alterações mais fregüentes da arvore biliar. Como consegüência dessa alta freguência, um grande esforço de pesquisas tem sido feito para o esclarecimento dessa afecção, principalmente com respeito aos cálculos de colesterol (MERCURI et al., 1998).

Os distúrbios do trato biliar atingem uma parcela significativa da população mundial. Mais de 95% das doenças que ocorrem no trato biliar são devidas a litíase biliar. Nos Estados Unidos, estima-se que mais de 30 milhões de pessoas tenham cálculos biliares. Além disso, estima-se também que cerca de 1 milhão de novos pacientes receberão o diagnóstico de litíase biliar anualmente, sendo que metade poderá ser submetida à cirurgia. Nos EUA, o custo anual com a colelitíase e suas complicações são de 6 a 8 milhões de dólares, representando 1% do orçamento nacional para a assistência médica (CRAWFORD, 2000).

A prevalência da litíase biliar é alta na Escandinávia, baixa no Japão e praticamente nula nas tribos Massai na África e é extremamente baixa entre os índios Pima no Arizona (MACHADO; RAIA, 1994).

Em 2006, Shaffer (2006) realizou uma pesquisa sobre a prevalência da litíase biliar. Alguns resultados de sua pesquisa encontram-se na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Prevalência da litíase biliar (modificada de SHAFFER, 2006).

População geográfica	Pro	evalência (%	Estudo	
	Homens	Mulheres	Total	
Montreal (Canadá)	65,9	51,4	61,5	Rather et al.
Índios Malpuche	12,6	49,4	35,2	Miquel et al.
Santiago (Chile)	14,5	37,4	28,5	Covarrubias et al.
Gotemburg (Suécia)	-	50,5	50,5	Mellstrom et al.
Copenhagen (Dinamarca)	18,8	30,2	24,0	Jorgensen et al.
Padua (Itália)	17,0	35,0	26,8	Lirussi et al.
Oberperfuss (Austria)	16,4	32,6	25,5	Rhomberg et al.
Schwedt (Alemanha)	(0-36,2)	(0-63,6)	9,7	Berndt et al.1
Oxford (Inglaterra)	-	21,7	21,7	Pixley et al.
Vidauban (França)	12,5	17,8	15,7	Caroli-Bosc et al.
Chandigard (Índia)	6,2	21,6	15,6	Singh et al.

Os primeiros trabalhos no Brasil sobre a litíase biliar foram realizados por Rocha (1977), no Triângulo Mineiro, e em São Paulo por Nakaie et al. (1982). O estudo de Nakaie sobre a incidência da litíase biliar no município de São Paulo utilizou 984 autópsias no serviço de óbitos. Ele concluiu que, no universo estudado, a ocorrência desse distúrbio era uma das maiores do mundo (apud MERCURI, 2000). Os trabalhos de Nakaie e Rocha, até 1998, eram as únicas pesquisas realizadas com material de necropsia no Brasil.

O uso clínico na determinação da prevalência da litíase biliar é muito limitado, pois cerca de 60% a 80% dos pacientes permanecem assintomáticos não fornecendo diagnóstico. Além disso, existe o alto custo dos métodos de diagnóstico por imagem (sendo o mais comum a ultra-sonografia), quando realizados em larga escala. Portanto, o estudo de necropsia é mais frequentemente utilizado.

Um estudo realizado no município de Campinas através necropsias, mostrou que de 2355 autópsias, em 243 (10%) encontrou-se uma incidência de litíase biliar (MANTOVANI et al., 2001).

¹ Berndt et al. estudou a prevalência da litíase biliar em ambos os sexos para diferentes faixas etárias de idade, encontrando uma variação de 0-36,2% para homens e 0-63,6% para mulheres.

Outro estudo, realizado por Torres et al. (2005) no Maranhão investigou a prevalência da litíase biliar em pacientes ambulatoriais através de exame ultrasonográfico constatando que dos 500 pacientes avaliados, 18,4% apresentaram litíase biliar. Esse estudo não foi realizado em pacientes de modo generalizado, pois pacientes com exame ultra-sonográfico da próstata, da pelve ou para diagnóstico e acompanhamento de gestação podem apresentar fatores pré disponentes².

Em Curitiba, Coelho et al. (1991) estudou a incidência da litíase biliar em pacientes hospitalizados por meio de análise ultra-sonográfica, verificando que dos 327 pacientes avaliados 57 (14,8%) apresentavam litíase biliar.

Ainda em Curitiba, Coelho et al. (1999) investigou a incidência da litíase biliar em 1000 pacientes com idade superior a 19 anos, de ambos os sexos, e selecionados aleatoriamente em dois Shopping Centers daquela cidade. Cada um dos pacientes realizou um exame ultra-sonográfico do abdômem. Constatou-se que 93 (9,3%) dos pacientes tinham ou tiveram litíase biliar, ou seja, já sofreram colecistectomia (cirurgia para a retirada da vesícula biliar).

Dessa forma Coelho realizou uma projeção estatística sobre os casos de litíase biliar no Brasil. Na época do referido estudo a população brasileira com idade superior a 20 anos era de 87 milhões de pessoas, e a prevalência da litíase biliar para pessoas com esta idade era de 9,3%. Com esses dados em 1999 Coelho pode estimar que aproximadamente 8 milhões de brasileiros tinham ou tiveram pedras de vesícula.

Como a litíase biliar é uma das afecções mais frequentes da árvore biliar e sua prevalência é bastante alta em vários países, o objetivo do presente trabalho é classificar as pedras de vesícula de doadores residentes no Estado do Espírito Santo e descrever a biocristalografia dessas pedras especificamente, determinar sua composição.

Por biocristalografia, entende-se que é o estudo de cristais crescidos *in vivo*.

Várias técnicas podem ser utilizadas para determinar os compostos presentes nas pedras, entre elas estão a análise termogravimétrica e a espectroscopia por infravermelho (MERCURI, 2000).

² Os fatores pré disponentes serão apresentados no capítulo 2.

Neste trabalho, utilizamos a técnica de difração de raios X por pó para fazer uma análise prévia da composição de 48 amostras coletadas no Estado do Espírito Santo. Utilizando apenas a técnica de difração de raios X por pó não foi possível determinar todos os compostos das amostras. Em 7 amostras foram feitas medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As avaliações de MEV nos trazem muitas informações a respeito da amostra. Com o sinal dos elétrons secundários (SE) podemos avaliar a topografia da amostra. Já com o sinal dos elétrons retroespalhados (BSD), obtemos um contraste de composição que, através da espectroscopia de energia dispersiva (EDS), conseguimos determinar quais são os elementos químicos presentes na amostra.

Na medida de difração de raios X por pó, a amostra é exposta a um feixe de raios X, dependendo da composição atômica e da orientação dos cristais contidos na amostra (caso ela seja cristalina), haverá reflexão do feixe de raios X, que é registrado na forma gráfica (padrão de difração). Cada composto tem um padrão de difração específico. Determinamos a composição das amostras comparando o padrão de difração obtido através da medida de difração de raios X por pó com um padrão previamente estabelecido. Esse método permite caracterizar até mesmo pequenas quantidades de amostra. Embora seja bastante eficiente, biocristalografia por raios X utiliza aparelhagem cara e requer técnicos especializados, dificultando sua utilização na prática clínica. Além disso, a análise das amostras não pode ser realizada in vivo.

Para facilitar o leitor, descreve-se abaixo como o assunto será exposto ao decorrer desta dissertação.

No capítulo 2, encontra-se uma descrição da árvore biliar, da litíase biliar e também alguns fatores que podem influenciar o aparecimento das pedras de vesícula e alguns métodos de classificação para diferentes tipos de pedras.

O capítulo 3 traz uma breve descrição da teoria de difração de raios X, luz síncrotron e algumas informações sobre o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

No capítulo 4 são encontradas informações sobre microscopia eletrônica de varredura, dentre as quais estão: princípio de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura, as informações que podemos obter através da medida de microscopia eletrônica de varredura, processo para preparação das amostras.

O capítulo 5 traz a metodologia experimental adotada para o desenvolvimento da pesquisa, aparelhagem utilizada, processo de preparação das amostras, avaliação e identificação das fases presentes nas amostras.

No capítulo 6, encontram-se os resultados e discussão e no capítulo 7 as conclusões do trabalho.

Referências do Capítulo 1

BERNDT, H.; NUMBERG, D. & PANNWITZ, H. Prevalence of cholelithiasis. Results of an a epidemiologic study using sonography in East Germany. **Z Gastroenterol**, v.27, p. 662-666, 1989.

CAROLI-BOSC; HASTIER, P.; DELABRE, B. et al. Prevalence and risk factors of gallstone disease in a town of South France (Vidauban) [abstract]. **Gastroenterology**, v.110, p.A9, 1996.

COELHO, J. C U.; FRARE, R. C.; ARCE, V. F. L.; PITAKI, S. A. M.; VÍTOLA, M. L. A.; GEORGE, M. A. D. Prevalence of gallstones in hospitalized patients in Curitiba - Ultrasonographic evaluation. **Rev Ass Med Brasil**, v.37, n.4, p.169-172, out./dez., 1991.

COELHO, J. C. U.; BONILHA, R.; PITAKI, S. A. M.; CORDEIRO, P. R. O. S.; BONIN, E. A.; HAHN, C. C.; SOARES, R. V.; MILSHESKI, D. A. Prevalence of gallstones in a Brasilian population. **Int Surg**, v.84, n.1, p.25-28,1999.

COVARRUBIAS, C.; MIQUEL, J.; PUGLIELLI, L. HOFMANN,E.; GIANCASPERO, R.; EBENSBERGER, E.; MIGRONE, G.; GRECO, A.; BUONI, C.; NERVI. F. The role of ethnicity and other risk factors for cholelithiasis in a highly prevalent area: Cross-sectional and cohort studied in Chileans and Amerindians Araucanos. **Gastroenterology**, v.108, n.4, p. A1053, 1995.

CRAWFORD J. M. O Fígado e o Trato Biliar. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000. p.800-803.

JORGENSEN, T. KAY, L. & SCHULTZ-LARSEN, K. The epidemiology of gallstones in a 70-year-old Danish population. **Scand J Gastroenterol**, v.25, n.4, p.335-340,1990.

LIRUSSI, F.; NASSUATO, G.; PASSERA, D.; TOSO, F.; ZALUNARDO, B.; MONICA, F.; VIRGILIO, C.; FRASSON, F.; OKOLICSANYI, L. Gallstone disease in na elderly population: the Silea study. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.11, n.5, 485-492,1999.

MACHADO, M. C. C.; RAIA, A. A. Colelitíase. In: RAIA, A. A.; ZERBINI, E. D. J., Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto, 4.ed. São Paulo: Sarvier, 1994. Cap 85 p. 830-833.

MANTOVANI, M.; LEAL, R. F.; FONTELES, M. J. Incidência de colelitíase em necrópsias realizadas em hospital universitário no município de campinas-SP. Rev. **Col. Bras. Cir.**, v.28, n.3, p. 259-263, Jul/ago.2001.

MELLSTROM, D.; ASZTELY, M. & SVANVIK, J. Gallstones and previous cholecystectomy in 77- to 78-year-old women I a urban population in Sweden. Scand **J Gastroenterol**, v.23, n.10, p.1241-1244,1988.

MERCURI, L. P. Estudo Termoanalítico e Caracterização Química de Cálculos Biliares e Bile Humana, 2000. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MERCURI, L. P.; CIRINO, L. M. I.; MARGARIDO, N. F.; MATOS, J. R. Estudo termoanalítico e caracterização química da litíase biliar. Rev. Med. HU-USP, v. 8, n. 2, p. 49-53, jul./dez. 1998.

MIQUEL, J.F.; COVARRUBIAS, C.; VILLAROEL, L.; MINGRONE, G.; GRECO, A. V.; PUGLIELLI, L.; CARVALLO, P.; MARSHALL, G.; DEL PINO, G.; NERVI, F. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanic, Amerindians, and Maoris. **Gastroenterology**, v.115, n.4, p.937-946, 1998.

NAKAIE M, BEVILACQUA RG, BIROLINI D. Incidência de colelitíase em autópsias no município de São Paulo. Rev Paul Med, v.100, n.2, p.11-15, 1982.

PIXLEY, F.; WILSON, D.; McPHERSON, K.; MANN, J. Effect of vegetarianism on development of gall stones in women. Br Med J (Clin Res Ed), v.291, n.6497,p.11-12, 1985.

RATHER, J.; LISBONA, A.; ROSENBLOOM, M.; PALAYEW, M.; SZABOLCSI, S.; TUPAZ, T. The prevalence of gallstone disease in very old institutionalizade persons. **J Am Med Assoc**, v.265, n.7, p.902- 903, 1991.

RHOMBERG, H.P.; JUDMAIR, G.; LOCHS, A. How common are gallstones? (letter). Br Med J (Clin Res Ed), v.289, n.6450, p.1002, 1984.

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

SHAFFER, E. A. Epidemiology of gallbladder sone disease. Best Practice & Research clinical Gastroenterology, v.20, n. 6, p.981-996, 2006.

SINGH, V.; TRIKHA, B. NAIN, C.; SINGH, K.; BOSE, S. Epidemiology of gallstone disease in Chandigarh: a community-based study. J Gastroenterol Hepatol, v.16, n.5, p.560-563, 2001.

TORRES, O. J. M.; BARBOSA E. S.; PANTOJA, P. B.; DINIZ, M. C. S.; SILVA, J. R. S.; CZECZKO, N. G. Prevalência ultra-sonográfica de litíase biliar em pacientes ambulatoriais. Rev. Col. Bras. Cir., v.32, n.1, p.47-49, Jan/Fev.2005.

<u>Capítulo 2</u>

2. A Árvore Biliar

2.1. Funções da Árvore Biliar

Uma das funções do fígado é secretar bile, que normalmente atinge valores entre 600 a 1000 ml/dia. A bile desempenha um importante papel na digestão e na absorção de gorduras devido aos ácidos biliares presentes em sua composição. Esses ácidos biliares exercem duas funções: (1) ajudam a emulsificar as grandes partículas gordurosas de alimentos em numerosas partículas pequenas, que podem ser atacadas pela lipase secretada no suco pancreático, (2) ajudam no processo de absorção dos produtos terminais da gordura digerida, através da membrana da mucosa intestinal.

A bile também serve como meio de excreção de vários produtos importantes de degradação do sangue. Esses produtos incluem, particularmente, a bilirrubina, (produto final da destruição da hemoglobina) e o excesso colesterol (GUYTON; HALL, 2002).

2.1.1. Secreção Biliar

A bile é secretada pelo fígado em duas etapas: (1) a porção inicial é secretada pelas principais células funcionais metabólicas do fígado, os hepatócitos. Essa secreção inicial contém grande quantidade de ácidos biliares, colesterol e outros constituintes orgânicos. Ela é secretada nos diminutos canalículos biliares localizados entre os hepatócitos e as lâminas hepáticas. Numa segunda etapa (2), a bile flui pelos canalículos para os septos interlobulares, onde os canalículos deságuam nos ductos biliares terminais e, a seguir, em ductos progressivamente maiores até alcançar o ducto hepático e o colédoco. A partir desses ductos a bile deságua diretamente no duodeno, ou é desviada para a vesícula biliar pelo cístico, como mostra a Figura 2.1. Em seu percurso pelos ductos biliares, a bile inicial recebe uma segunda secreção. Essa secreção adicional consiste em solução aquosa de íons sódio e bicarbonato secretado por células epiteliais secretoras que revestem os dúctulos e ductos. Essa segunda secreção, algumas vezes, aumenta a quantidade total de bile em até 100%. A segunda secreção é estimulada pela secretina, que induz a liberação de quantidade aumentada de íons bicarbonato para suplementar os íons bicarbonato nas secreções pancreáticas primárias, a fim de neutralizar o ácido proveniente do estômago que deságua no duodeno (GUYTON; HALL, 2002).

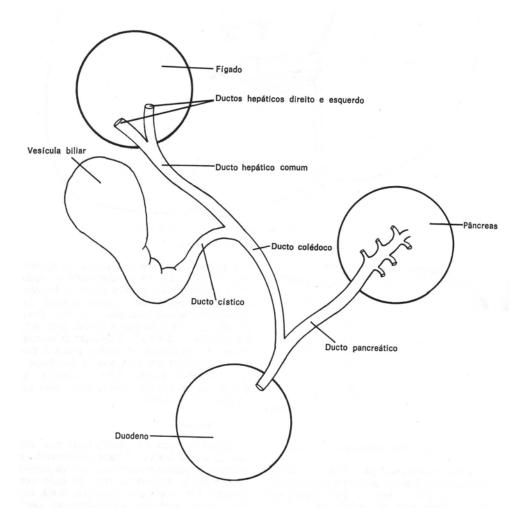


Figura 2.1 - Desenho esquemático das vias biliares (DÂNGELO; FATTINI 2002).

A bile hepática apresenta as seguintes características físico-químicas: cor amareloouro, densidade 1.010 g/cm³ e pH de 7,5 a 8. Possui os seguintes componentes:

- Eletrólitos: sódio, potássio, magnésio, cálcio, cloreto e bicarbonato.
- Componentes orgânicos: sais biliares, bilirrubina, colesterol, fosfolipídios, baixa concentração de ácidos graxos, mucina, aminoácidos, além de substâncias exógenas (AIRES; SANIOTO, 1999).

Os componentes constituintes da bile encontram-se organizados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição da bile hepática humana (AIRES; SANIOTO, 1999).

Constituintes	Concentrações	mg	% Sólidos
	mEq/l		Totais
Sódio	146-165		
Potássio	2,7-4,9		
Cálcio	2,5-4,8		
Magnésio	1,4-3,0		
Cloreto	88-115		
Bicarbonato	24-55		
Sais Biliares		1.800	8-53
Colesterol		130	3-11
Bilirrubina		92	0,4-2,0
Lecitina		710	9-21

A bile é continuamente secretada pelas células hepáticas, porém a maior parte é armazenada na vesícula biliar, até que se faça necessária no duodeno. O volume máximo da vesícula biliar é de apenas 30 a 60 mililitros. Entretanto, a vesícula biliar pode armazenar até 12 horas de secreção biliar (em geral cerca de 450 mililitros), visto que a água, o sódio, o cloreto e a maioria dos outros eletrólitos pequenos têm absorção contínua pela mucosa da vesícula biliar. Desse modo ocorre uma concentração dos constituintes remanescentes da bile, incluindo os sais biliares, o colesterol, a lecitina e a bilirrubina. A maior parte da absorção da vesícula biliar é efetuada por transporte ativo do sódio, através do epitélio vesicular, seguido da absorção secundária de íons cloreto, de água, e da maioria dos outros constituintes de fácil difusão. Para um melhor entendimento do leitor colocou-se na Figura 2.2 uma visão interna da vesícula biliar. Em condições normais, a bile vesicular apresenta uma concentração até cinco vezes maior que a bile hepática, porém pode apresentar até um máximo de 20 vezes ocasionando uma supersaturação de seus componentes (GUYTON; HALL, 2002).

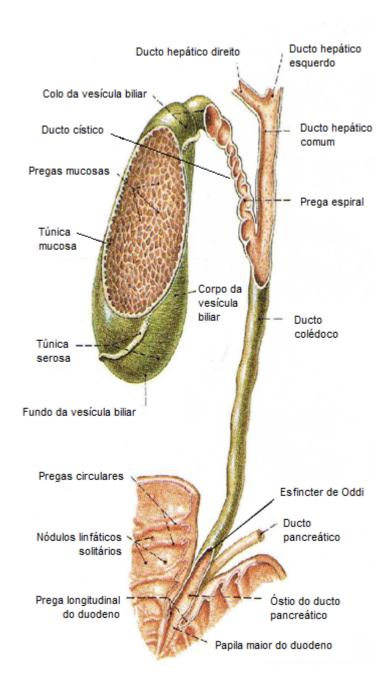


Figura 2.2- Vista esquemática da vesícula biliar e ductos bilíferos. As partes anteriores da vesícula biliar, dos ductos bilíferos e do duodeno foram removidas para expor a túnica mucosa (modificada de SOBOTTA, 2000).

O volume da bile vesicular em relação a hepática sofre uma redução de 80% a 90% em consequência da reabsorção de água, cloreto de sódio e bicarbonato do lúmem da vesícula para a corrente sanguínea. A bile vesicular contém alta concentração de sais biliares (cerca de 10 vezes maior que o da bile hepática), mucina, bilirrubina, potássio e cálcio, como mostra a Tabela 2.2. Devido a isso, o pH da bile vesicular é menor oscilando de 5,0 a 6,0 (AIRES; SANIOTO, 1999).

Tabela 2.2 - Composição da bile hepática e vesicular humana (AIRES; SANIOTO, 1999).

Constituintes	Bile Hepática	Bile Vesicular
	(%)	(%)
Água	97,48	83,98
Mucina e bilirrubina	0,53	4,44
Sais biliares	0,93	8,70
Ácidos graxos	0,12	0,85
Colesterol	0,06	0,87
Lecitina	0,02	0,14
Íons inorgânicos	0,83	1,02

Quando o alimento começa a ser digerido na porção superior do trato gastrintestinal, a vesícula biliar começa a se esvaziar, principalmente quando alimentos gordurosos chegam ao duodeno. Esse mecanismo atua após 30 minutos a refeição. A causa do esvaziamento da vesícula biliar reside nas contrações rítmicas da parede da vesícula biliar; entretanto seu esvaziamento eficaz também requer o relaxamento simultâneo do esfíncter de Oddi, que protege a passagem do colédoco para o duodeno.

O estímulo que provoca as contrações da vesícula biliar é o hormônio colecistocinina. O estímulo para a secreção de colecistocinina da mucosa duodenal para o sangue consiste, principalmente, na entrada de alimentos gordurosos no duodeno.

Além da colecistocinina, a vesícula biliar é estimulada, ainda que menos intensamente, por fibras nervosas secretoras de acetilcolina dos nervos vagos e do sistema nervoso entérico. Sendo assim, a vesícula biliar libera seu depósito de bile concentrada duodeno. principalmente no em resposta ao estímulo colecistocinina, que é iniciado pela presença de alimentos gordurosos. Quando não há gordura na refeição, a vesícula biliar pouco se esvazia, entretanto, em presença de quantidade significativa de gordura, a vesícula biliar normal tem esvaziamento completo em cerca de 1 hora (GUYTON; HALL, 2002).

Função dos Sais Biliares na Digestão e Absorção de Gorduras

As células hepáticas sintetizam cerca de 0,6 grama de sais biliares diariamente. O precursor dos sais biliares é o colesterol, fornecido na dieta ou sintetizado nas células hepáticas durante o metabolismo das gorduras. Inicialmente o colesterol é convertido em ácido cólico, ou ácido quenodesoxicólico, em quantidades aproximadamente iguais. Por sua vez esses ácidos combinam-se principalmente com glicina e, em menor grau, com taurina formando os ácidos biliares glico e tauroconjugados. Os sais desses ácidos, principalmente os sais de sódio são secretados na bile.

Os sais biliares exercem duas ações importantes no trato intestinal:

- Função de emulsificação ou detergente os sais biliares exercem ação detergente sobre as partículas de gordura do alimento diminuindo a tensão superficial da mesma. Com esta ação permite-se que a agitação no tubo intestinal desintegre os glóbulos de gordura em partículas de pequenas dimensões.
- Absorção os sais biliares ajudam na absorção de ácidos graxos, monogliceríeos, colesterol e outros lipídios do trato intestinal formando diminutos complexos com esses lipídios. Esses complexos, denominados micelas são solúveis no quimo em virtude das cargas elétricas dos sais biliares. Os lipídios são transportados dessa forma até a mucosa, onde são absorvidos. Na ausência de sais biliares no trato intestinal, até 40% dos lipídios ingeridos são perdidos nas fezes, o que causa com frequência no indivíduo o desenvolvimento de um déficit metabólico devido a essa perda de nutrientes.

2.3. Litíase Biliar

A litíase biliar é caracterizada pela presença de cálculos na vesícula biliar. Esses cálculos são classificados basicamente em dois tipos: colesterol e pigmentares (KARANJLIA; ALI, 2006), porém sua composição varia de acordo com a população mundial (ANGWAFO III; TAKONGMO; GRIFFITH, 2004). Os cálculos mais comuns na América e Europa são constituídos de cristais de colesterol (MACHADO; RAIA, 1994).

Certas populações são bem mais propensas a desenvolver cálculos biliares do que outras. Muitos fatores podem influenciar o aparecimento dessa afecção, tais como:

- Etnia-geografia A prevalência de cálculos biliares de colesterol aproximase de 75% em nortes americanos nativos da primeira migração da Ásia, que inclui Pima, Hopi e Navajo³. A prevalência da litíase é maior em sociedades industrializadas, sendo pouco comum nas sociedades subdesenvolvidas ou em desenvolvimento.
- Idade A prevalência da litíase aumenta com a idade.
- Sexo A incidência é maior em pessoas do sexo feminino. A gravidez está associada com alteração do mecanismo normal de esvaziamento vesicular.
- Obesidade Aumenta a supersaturação da bile, com isso o risco de se desenvolver cálculos também aumenta.
- Terapia de contraceptivo oral é associada com o aumento da saturação do colesterol, e algumas dessas drogas fazem com que aumente a incidência de cálculos.
- Anemia hemolítica Esta associada com a formação de cálculos pigmentares.
- Fatores hereditários Além da etnia, a história familiar confere um risco aumentado para a incidência de cálculos.

Existem outros fatores que também estão associados à incidência da litíase biliar, como: distúrbios gástricos, drogas como clofibrate, que inibe a síntese de colesterol, ressecção do íleo terminal ou das diversas operações de exclusão intestinal

³ Pima, Hopi e Navajo são tribos indígenas situadas no Estado do Arizona nos Estados Unidos.

utilizadas para o tratamento da obesidade mórbida, nutrição parenteral total, vagotomia troncular (CRAWFORD, 2000; MACHADO; RAIA, 1994; KARANJLIA; ALI, 2006).

Formação dos Cálculos de Colesterol 2.3.1.

O mecanismo proposto (MACHADO; RAIA, 1994) para a formação dos cálculos de colesterol descreve três estágios: saturação, nucleação e crescimento.

Quando a capacidade máxima de solubilidade de colesterol é atingida ou ultrapassada, a bile torna-se saturada ou supersaturada. Embora não se saiba exatamente como se manifesta o fenômeno, acredita-se que a cristalização do colesterol e nucleação ocorra em níveis levemente acima do limite de saturação.

Há vários fatores que podem interferir para a formação dos cálculos, tais como pH e estrutura química dos sais biliares, além de outros agentes como pigmentos biliares e bactérias. Corpos estranhos podem servir como núcleo para a precipitação do colesterol. Após a precipitação do núcleo, o processo de crescimento do cálculo é contínuo.

O colesterol torna-se solúvel na bile pela agregação de sais biliares hidrossolúveis e lecitinas hidroinsolúveis, ambos os quais atuam como detergentes. Quando as concentrações de colesterol excedem a capacidade solubilizante da bile (supersaturação), o colesterol deixa de permanecer disperso e nucleia-se em cristais sólidos de monoidrato de colesterol. A formação de cálculos biliares de colesterol envolve uma tetralogia de disfunções simultâneas ilustrada na Figura 2.3.

- A bile deve estar supersaturada com colesterol.
- A hipomotilidade da vesícula biliar promove a nucleação.
- A nucleação de colesterol na bile é acelerada.
- A hipersecreção de muco na vesícula biliar aprisiona os cristais, permitindo sua aglomeração em cálculos.

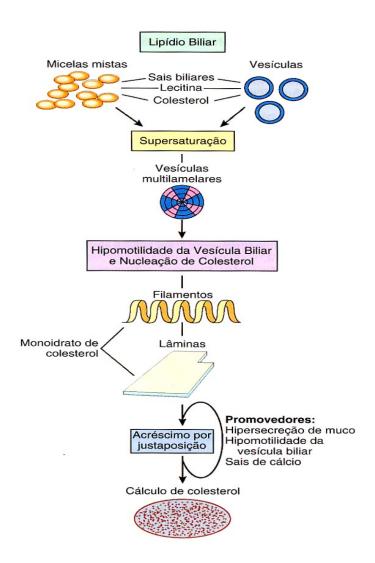


Figura 2.3 - Representação esquemática dos quatro fatores que contribuem para a litíase biliar: supersaturação, hipomotilidade da vesícula biliar, nucleação de cristais e acréscimo por justaposição dentro da camada de muco na vesícula biliar (CROWFORD, 2000).

A hipersecreção biliar do colesterol parece ser uma disfunção primária, mediada possivelmente por um maior transporte de colesterol plasmático nas lipoproteínas circulantes até a bile e pela regulação anormal das vias hepáticas de biossíntese de colesterol. O colesterol livre em excesso é tóxico para a vesícula biliar, sobrepujando a capacidade da mucosa de desintoxicá-la por esterificação. A hipomotilidade, hipersecreção de mucina e resultante sequestro de bile vesicular promovem nucleação e aglomeração (CROWFORD, 2000).

Cálculos Pigmentares 2.3.2.

Não são encontradas na literatura muitas informações sobre os cálculos pigmentares. Acredita-se que esses cálculos são formados por misturas de bilirrubina não conjugada com sais de cálcio inorgânicos. A bilirrubina não conjugada normalmente é um composto em pequena porcentagem na bile, mas aumenta quando uma há uma infecção do trato biliar, como a infecção por Escherichia coli, Ascaris lumbricoides ou, na Ásia, pelo trematóide hepático Opisthrorchis sinensis, que aumentam a chance de formação de cálculos biliares pigmentares (CROWFORD, 2000).

Manifestações Clínicas Devido aos 2.3.3. Cálculos Biliares

Os cálculos biliares podem estar presentes há décadas antes do aparecimento de sintomas, e 70% a 80% dos pacientes permanecem assintomáticos durante toda a vida. Dentre os principais sintomas está a dor biliar, que tende a ser constante, ou uma dor, em cólica (espasmódica) excruciante, devida a natureza obstrutiva dos cálculos na vesícula biliar ou na própria árvore biliar. A inflamação da vesícula biliar (colecistite), em associação aos cálculos também gera dor. As complicações mais graves incluem empiema, perfuração, fístulas, inflamação da árvore biliar (colangite) e colestase obstrutiva ou pancreatite. Quanto maiores os cálculos, menor a probabilidade de que eles entrem no ducto cístico ou colédoco para produzir obstrução, um esquema das complicações da litíase biliar é encontrado na Figura 2.4. Portanto, os cálculos muito pequenos oferecem maior perigo (CRAWFORD, 2000).

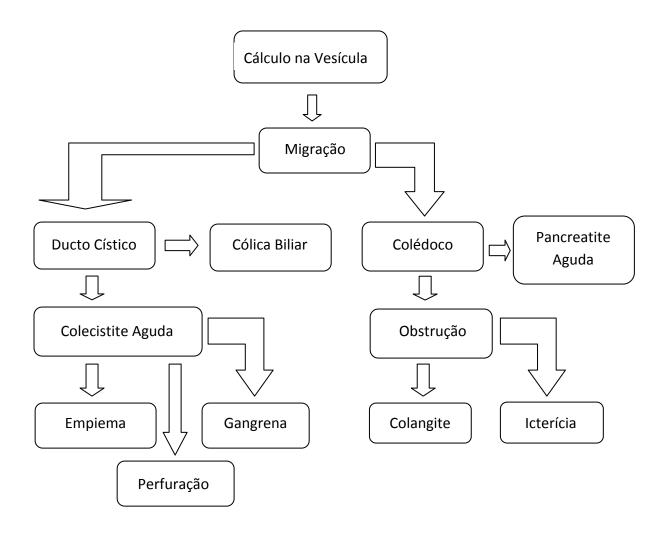


Figura 2.4 - Desenho esquemático das complicações causadas pela litíase biliar.

Outros Métodos de Classificação dos 2.3.4. Cálculos Biliares

Estudos mais recentes sugerem uma outra classificação para os cálculos biliares. Em 1998 no Brasil, Mercuri et al. (1998) propôs que a classificação dos cálculos biliares fosse feita através da porcentagem de carbono e hidrogênio presente nas pedras. Com isso classificou as pedras em seis grupos de acordo com a porcentagem de cada componente encontrado.

Já em 2004, Kodaka et al. (2004), classificou as pedras de vesícula em cinco grupos I, II, III, IV e V, de acordo com a sua composição. Todos os casos são classificados basicamente como de colesterol, pigmento marrom e pigmento preto, o caso IV foi classificado como sendo de fosfato de cálcio e o caso V foi classificado como um tipo raro, pois nessa amostra foram encontrados ferro e silício.

Segundo Kodaka, cada tipo de pedra ou cada caso tem um tipo de formação diferente. Para o caso I ele sugeriu que a formação começa com uma precipitação inicial de algum tipo de cálcio, formando um substrato, provavelmente de palmitato de cálcio. Depois cristais de colesterol agregaram-se em torno desse núcleo de cálcio, formando a pedra, essa formação é considerada homogênea. No caso II a formação da pedra se inicia com uma grande precipitação de palmitato de cálcio formando um substrato. Após essa formação partículas de bilirrubinato de cálcio, apresentando periódicas laminações, vão se depositando de forma concêntrica em torno do palmitato de cálcio, esse caso também é considerado homogêneo. O grupo III foi considerado de formação heterogênea, pois algumas amostras apresentaram compostos como fosfato de cálcio em seu núcleo, bilirrubinato de cálcio e cristais de colesterol em sua periferia. Outras amostras apresentaram apenas bilirrubinato de cálcio e colesterol. A formação da pedra no caso IV inicia-se com a precipitação de palmitato de cálcio formando um substrato, posteriormente depósitos de colesterol se depositam radialmente formando um núcleo, após essa formação fosfato de cálcio e palmitato de cálcio se depositam de forma concêntrica em sua periferia. Isso pode acelerar o crescimento da pedra. No caso V, o ferro pode ter servido de substrato para depósitos de cálcio, o elemento silício encontrado na amostra pode ter sido derivado de alguma verdura, esse caso também é considerado heterogêneo.

Referências do Capítulo 2

AIRES, M. M.; SANIOTO, D. L. Sistema Digestivo: Secreção. In: AIRES, M. M. Fisiologia, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. p.671-676.

ANGWAFO III, F. F.; TAKONGMO, S.; GRIFFITH, D., Determination of chemical composition of gall blader stones: Basis for treatment strategies in patients from Yaounde, Cameroon, **World J Gastroenterol**, v.10, n.2, p.303-305, 2004.

CRAWFORD J. M. O Fígado e o Trato Biliar. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000. p.800-803.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**, 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. cap.X, p.132.

GUYTON, A. C.; HALL J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. cap. 65, p.696-698.

KARANJLIA, N.; ALI, T. Gallstones. Surgery, v.25, n.1, p.16-21, 2006.

KODAKA, T.; SANO, T.; NAKAGAWA, K.; KAKINO, J.; MORI, R. Structural and analytical comparison of gallbladder stones collected from a single patient: studies of five cases, **Med Electron Microsc**, v.37, n.2, p.130-140, 2004.

MACHADO, M. C. C.; RAIA, A. A. Colelitíase. In: RAIA, A. A.; ZERBINI, E. D. J., Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto, 4.ed. São Paulo: Sarvier,1994. Cap 85 p. 830-833.

MERCURI, L. P.; CIRINO, L. M. I.; MARGARIDO, N. F.; MATOS, J. R. Estudo termoanalítico e caracterização química da litíase biliar. **Rev. Med. HU-USP**, v. 8, n. 2, p. 49-53, jul./dez. 1998.

SOBOTTA, J. Atlas de Anatomia Humana Volume 2 Tronco, Vísceras e Extremidade Inferior, 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000. p.146.

Capítulo 3

Difração de Raios X

3.1. Histórico

Em 8 de novembro de 1895, o físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen acidentalmente descobriu um raio, quando fazia experiências com raios catódicos. Ele os chamou de raios X por causa de suas propriedades físicas desconhecidas (BLEICHER; SASAKI, 2000).

Em 1912, Laue sugeriu que, como os comprimentos de onda dos raios X eram da mesma ordem que o espaçamento dos átomos em um cristal, os átomos de um cristal poderiam se comportar como uma rede de difração tridimensional para os raios X. Os experimentos logo confirmaram que os raios X são uma forma de radiação eletromagnética (TIPLER; LLEWELLYN, 2001).

A difratometria de raios X corresponde a uma das técnicas mais importantes na caracterização microestrutural de materias cristalinos, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento, mais particularmente em engenharia e ciências de materiais, engenharia metalúrgica, química e de minas, geociências, dentre outros (KAHN, 2007).

3.2. Produção de Raios X

Os raios X podem ser produzidos em laboratório pela colisão de um feixe de elétrons com um alvo metálico (SANTOS, 2005). O espectro é constituído por uma série de linhas estreitas, conhecida como espectro característico, superpostas a um espectro contínuo, também conhecido como Bremsstrahlung (TIPLER; LLEWELLYN, 2001). A radiação contínua é produzida pela desaceleração dos elétrons no átomo do elemento alvo (SANTOS, 2005). A Figura 3.1 mostra para quatro valores diferentes de energia dos elétrons incidentes, como a energia dos raios X emitidos por um alvo de tungstênio se distribui em função do comprimento de onda.

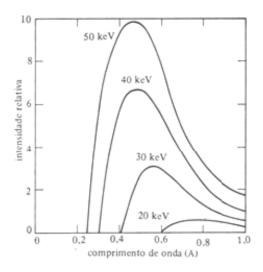


Figura 3.1 - O espectro contínuo de raios X que é emitido de um alvo de tungstênio, para quatro diferentes valores de energia dos elétrons incidentes (EISBERG; RESNIK, 1979).

O espectro contínuo apresenta um comprimento de onda de corte λ_{min} , que depende apenas da energia dos elétrons incidentes (TIPLER; LLEWELLYN, 2001). Podemos calcular λ_{min} através da equação 3.1, onde h é constante de Planck, c é a velocidade da luz e V é a energia dos elétrons incidentes.

$$\lambda_{\min} = \frac{hc}{V} = \frac{12,398}{V}$$
 (3.1)

A Figura 3.2 mostra as linhas estreitas (espectro característico). O comprimento de onda das linhas características depende do material do alvo e são sempre as

mesmas para um dado material (TIPLER; LLEWELLYN, 2001). A intensidade dessas linhas depende da corrente do tubo de raios X e da voltagem utilizada. Dessa forma o comprimento de onda λ_{min} , corresponde a energia que um elétron pode perder em uma colisão (SANTOS, 2005).

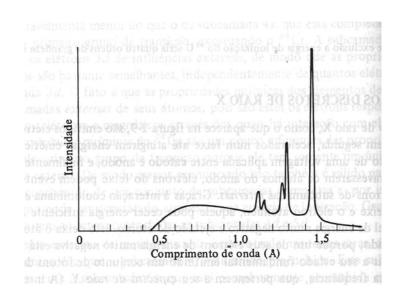


Figura 3.2 - Um espectro de Raios X típico. As linhas são características dos átomos do anodo do tubo de raios X (tungstênio no caso acima). O continum provém do bremmstrahlung produzido pelos elétrons acelerados no espalhamento com a eletrosfera desses átomos (EISBERG; RESNIK, 1974).

A produção da radiação é baseada na interação entre os elétrons do átomo e a partícula incidente. O elétron do átomo alvo pode ser removido da sua posição atômica e deixar o átomo ionizado. O elétron livre é chamado fóton-elétron que sairá do átomo com energia cinética $E-\phi_e$ onde E é a energia do fóton incidente e ϕ_e é a energia do elétron ligado. Quando um elétron da camada L é transferido para a camada K ocupando uma vacância do nível, ocorre o efeito de produção de fótons com energia igual a $\phi_k-\phi_l$ que é chamado de fóton de raios X K_{α}. A energia dessa radiação é dada pela equação 3.2:

$$E = h\psi = \frac{hc}{\lambda} \tag{3.2}$$

onde h é a constante de Planck e c é a velocidade da luz. A região do espectro eletromagnético que corresponde aos raios X está entre 0,1-100Å. Em energia está no intervalo de 0,1-100 keV.

A energia de cada nível varia com o elemento do alvo. Sendo assim, cada tipo de alvo produz radiações características em diferentes comprimentos de onda. A Tabela 3.1 mostra alguns detalhes sobre os comprimentos de onda para os materiais mais utilizados em tubos de raios X.

Tabela 3.1- Radiação característica dos principais materiais utilizados em tubos de raios X.

Elemento	$K_{\alpha 1}(\text{Å})$	$K_{\alpha 2}(\text{Å})$	K _{β1} (Å)
Cr	2,28970	2,29361	2,08487
Fe	1,93604	1,93998	1,75661
Co	1,78896	1,79285	1,62079
Cu	1,54056	1,54439	1,39221
Мо	0,70930	0,71359	0,63228

A limitação fundamental no uso de tubos de raios X é que intensidade máxima do feixe está limitada para se evitar o aquecimento demasiado do alvo. A produção de raios X através de tubos não é muito eficiente, sendo que a maior parte da energia do feixe de elétrons incidente se perde na forma de calor. Em parte, isso pode ser resolvido usando-se alvos giratórios, de forma que o feixe de elétrons não incida em uma única área do anodo. Adiciona-se a ineficiência o fato de que o tubo emite radiação em todas as direções, isso reduz em muito a intensidade que atinge a amostra. Além disso, o comprimento de onda dado por um tubo de raios X não é sintonizável. Esses problemas podem se resolvidos utilizando-se fontes de luz síncrotron (SANTOS, 2005).

Radiação Síncrotron 3.3.

A luz de uma fonte síncrotron é produzida, quando ocorre a emissão de radiação pela deflexão por campos magnéticos de um feixe de cargas elétricas aceleradas com velocidades relativísticas. Essas cargas percorrem uma órbita circular fechada, dentro de um sistema de ultra alto vácuo (anel de armazenamento). Para obter grandes intensidades e um largo espectro de energia é necessário que as partículas sejam altamente relativísticas, portanto a radiação e a intensidade serão diretamente influenciadas pela massa das partículas. Portanto posítrons e elétrons são partículas que podem ser usadas para investigação científica com um custo tecnológico compatível com o grau de investimento realizado no Brasil.

As principais características da luz síncrotron são: alta intensidade, amplo espectro de energia, polarização da luz emitida e presença de uma estrutura temporal. A grande maioria das fontes de radiação síncrotron utiliza feixe de elétrons com energia cinética da ordem de GeV.

A luz síncrotron é emitida na direção tangencial à trajetória das partículas e com quase toda intensidade colimada no plano da órbita. Portanto a luz emitida tem a forma de um leque como mostra a Figura 3.3, abrangendo uma ampla faixa do espectro eletromagnético: raios X, luz ultravioleta e infravermelha, além da luz visível, que sensibiliza o olho humano, são emitidas pela fonte, dessa forma uma parte dessa luz é levada para fora do anel onde é aproveitada nas diversas estações experimentais distribuídas dentro de um laboratório síncrotron.

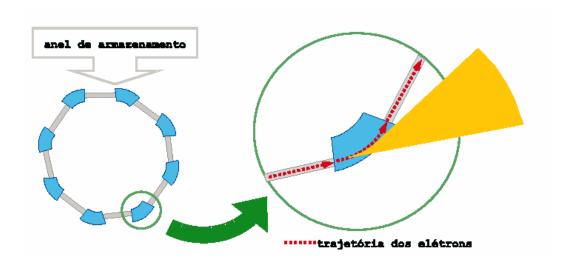


Figura 3.3 - A luz emitida pela deflexão do feixe nos dipolos é emitida na direção tangencial à trajetória descrita pelas partículas, formando um leque. Dessa luz emitida, uma parte é retirada para ser aproveitada como instrumento de prova em uma série de experiências (PASSAMAI, 2005).

É com esta luz que cientistas estão descobrindo novas propriedades físicas e químicas existentes em átomos e moléculas (PASSAMAI, 2005).

Detalhes do Laboratório Nacional de Luz 3.3.1. Síncrotron (LNLS)

O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron construído em Campinas entrou em funcionamento em 2 de julho de 1997 e está ligado ao Ministério da ciência e tecnologia (MCT). Ele é o único laboratório de luz síncrotron da América Latina. Esse acontecimento tem como principal consequência a oportunidade da comunidade científica brasileira de realizar pesquisas cientificas de padrão internacional.

A fonte de luz síncrotron do LNLS é composta por um anel de armazenamento de 1,37 GeV, um acelerador linear (LINAC) e um síncrotron injetor de elétrons (booster).

O LINAC é composto por duas partes, um acelerador linear e um pré-injetor. O préinjetor é uma espécie de tubo de raios catódicos com a finalidade de criar os elétrons do processo. O acelerador é composto por quatro seções de aceleração, do tipo gradiente constante, operando sob vácuo de 5,0x10⁻⁸ Torr, sendo sua energia final de 100 MeV. Após saírem do acelerador os elétrons são injetados com baixa energia no booster.

O booster é um acelerador circular posicionado entre o acelerador linear e o anel de armazenamento de elétrons. Os elétrons que chegam do acelerador linear são acelerados até atingirem a energia de 500 MeV. Ao atingirem essa energia os elétrons são injetados no anel de armazenamento.

O anel de armazenamento é composto de 12 dipolos, que tem a finalidade de garantir a órbita fechada dos elétrons e produção de radiação. Atualmente existem em operação 13 linhas de luz. Entretanto é possível construir um total de 24 linhas com radiação proveniente dos dipolos magnéticos simultaneamente, e também a implementação de mais quatros dispositivos de inserção (LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTRON, acesso em 01 jun. 2009).

3.4. Difração de Raios X e a Lei de Bragg

O espalhamento e a consequente difração de raios X é um processo que pode ser analisado em diferentes níveis. No mais básico deles, há o espalhamento de raios X por um elétron. Esse espalhamento pode ser coerente ou incoerente. No espalhamento coerente, a onda espalhada tem direção definida, mesma fase e mesma energia em relação à onda incidente. Trata-se de uma colisão elástica. No espalhamento incoerente, a onda espalhada não tem direção definida. Ela não mantém a fase nem a energia (é o chamado Efeito Compton). A colisão é inelástica, e a energia referente à diferença entre a onda incidente e a onda espalhada traduzse em ganho de temperatura (vibração do átomo) (BLEICHER; SASAKI, 2000).

Se um feixe de raios X, com uma dada frequência incidir, sobre um átomo isolado sabe-se que elétrons desse átomo serão excitados e vibrarão, emitindo raios X em todas as direções com a mesma frequência do feixe incidente. Quando os átomos estão regularmente espaçados em um reticulado cristalino e a radiação incidente tem comprimento de onda da ordem deste espaçamento, ocorrerá interferência construtiva em certas direções e interferência destrutiva em outras. A difração ocorre na direção onde há interferência construtiva.

Para que as ondas refletidas interfiram construtivamente é necessário que a diferença de caminho entre os raios (incidente e refletidos), seja um múltiplo inteiro do comprimento de onda λ da radiação monocromática incidente, satisfazendo a condição de Bragg (equação 3.3) como mostra a Figura 3.4.

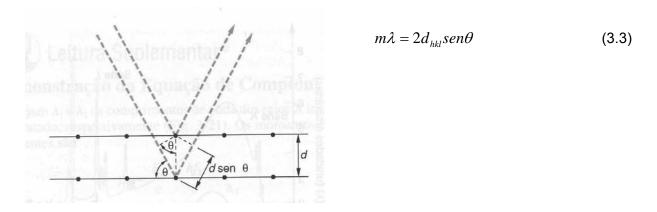


Figura 3.4 - Difração de Bragg para dois planos paralelos (TIPLER; LLEWELLYN,1978).

Estrutura Cristalina 3.5.

Uma estrutura cristalina é uma rede de pontos regularmente espaçados com uma distribuição regular dos átomos, ilustrada na Figura 3.5.

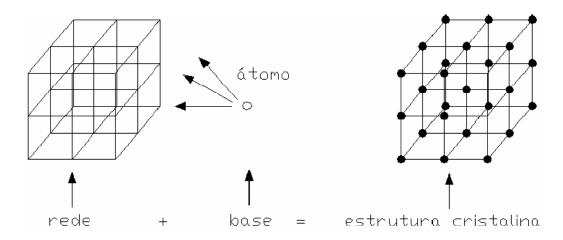


Figura 3.5 - Esquema ilustrativo da construção de um sólido.

Materiais cristalinos são aqueles que possuem uma distribuição característica e regular dos seus átomos. Sendo assim, a estrutura cristalina de um material não precisa ser representada por todos os seus átomos, mas por apenas um conjunto de átomos que possam definir a sua distribuição no espaço. A esta pequena porção da estrutura cristalina, que tem a propriedade de representar todo o cristal chamamos de célula unitária e que está associada a uma figura geométrica e a distribuição característica dos átomos (CALISTER, 1994). Existem sete figuras geométricas que representam sete sistemas cristalinos, que por sua vez irão formar quatorze distribuições características dos átomos, produzindo quatorze estruturas cristalinas, que chamamos de Redes de Bravais (GAELZER, 2008).

3.5.1. Rede de Bravais

A manifestação por parte dos cristais de anisotropias de certas propriedades físicas, aliadas à idéia de descontinuidade da matéria, levaram os cristalógrafos a atribuir aos cristais uma estrutura regular, denominada estrutura cristalina. Esta estrutura cristalina pode ser descrita pela repetição periódica de átomos ou agrupamentos de átomos. Diz-se, por essa razão, que a matéria cristalina apresenta uma homogeneidade periódica, quanto à distribuição das suas unidades elementares. Esta distribuição regular resulta em uma construção simétrica, que pode ser descrita mediante uma distribuição regular de operadores de simetria (rotação, translação, etc) (NELSON, 2003). A estrutura cristalina é uma construção matemática de simetria espacial na qual o objeto de repetição é um átomo, ou um grupo de átomos. Os grupos de simetria em três dimensões necessitam de quatorze tipos de redes diferentes listados na Tabela 3.2. A rede geral é a triclínica e existem 13 redes especiais. Essas redes são agrupadas por conveniência em sistemas classificados de acordo com os sete tipos de células; triclínica, monoclínica, ortorrômbica, tetragonal, cúbica, trigonal e hexagonal (Figura 3.6) A divisão nesses sistemas esta expressada na Tabela 3.2 em termos da relação entre os eixos que descrevem as células (KITTEL, 2005).

Tabela 3.2 - Classificação das estruturas cristalinas dentro dos sistemas cristalinos.

Sistema cristalino	Parâmetros de rede e ângulo entre os eixos	Estrutura cristalina
Cúbico	Três eixos iguais em ângulo reto. $a=b=c,\ \alpha=\beta=\gamma=90^{\circ}$	Cúbica simples Cúbica de corpo centrado Cúbica de face centrada
Tetragonal	Três eixos em ângulo reto, dois iguais. a=b≠c, α=β=γ=90°	Tetragonal simples Tetragonal de corpo centrado
Ortorrômbico	Três eixos desiguais em ângulo reto. a≠b≠c, α=β=γ=90°	Ortorrômbico simples Ortorrômbico de corpo centrado Ortorrômbico de base centrada Ortorrômbico de face centrada
Romboédrico	Três eixos iguais, ângulos iguais. a=b=c, α=β=γ ≠90°	Romboédrico simples
Hexagonal	Dois eixos iguais, dois ângulos iguais a 90°, terceiro a120°. a=b≠c, α=β=90° γ=120°	Hexagonal simples
Monoclínico	Três eixos desiguais, um ângulo diferente. a≠b≠c, α=γ=90°, β≠90°	Monoclínico simples Monoclínico de base centrada
Triclínico	Três eixos desiguais, ângulos desiguais. a≠b≠c, α≠β≠γ≠90°	Triclínico simples

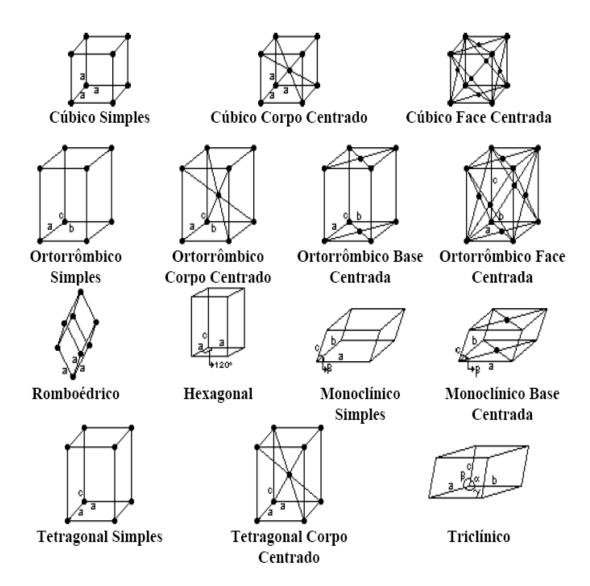


Figura 3.6 - Redes de Bravais em 3D.

Uma descrição mais formal para a rede de Bravais é dada a seguir:

- 1. Uma rede de Bravais é uma rede infinita de pontos discretos, com arranjo e orientação idêntica seja qual for o ponto espacial de onde a rede é observada.
- 2. Uma rede de Bravais tri-dimensional consiste em todos os pontos com vetores de posição R na forma:

$$\mathbf{R} = n_1 \mathbf{a_1} + n_2 \mathbf{a_2} + n_3 \mathbf{a_3} \tag{3.4}$$

onde **a**₁, **a**₂ **e a**₃ são quaisquer vetores, não todos no mesmo plano, e n₁, n₂ e n₃ são três números inteiros quaisquer. Os vetores a_i , onde i = 1, 2 e 3, são denominados vetores primitivos e a combinação linear (3.4) é dita geradora ou varredora da rede cristalina (GAELZER, 2008).

3.6. Método do Pó

Esse método (apud BORGES, 1994) foi desenvolvido pelo cientista Holandês P. Debye e pelo suíço P. Sherrer, em 1916, e independentemente, pelo norte americano A. Hull em 1917. Este método utiliza a amostra em forma de pó que é colocado dentro de uma câmara de Debye-Sherrer.

A câmara de Debye-Sherrer compreende um dispositivo cilíndrico no qual a amostra é acondicionada em um capilar posicionado bem no centro da câmara sobre o qual é focalizado um fino feixe de raios X (KAHN, 2007).

O tempo de exposição aos raios X depende de uma série de fatores: dimensões da câmara, abertura de entrada do feixe incidente e ainda da composição da amostra.

Quando o feixe de raios X monocromático incide no pó cristalino, dada a distribuição aleatória dos inúmeros pequenos grãos, qualquer plano reticular assume todas as orientações possíveis, relativamente ao feixe incidente. Desse modo, ocorre sempre uma incidência segundo um ângulo qualquer que satisfaça a Lei de Bragg. Dessa forma, é possível registrar todas as direções hkl estruturalmente possíveis, desde que sejam suficientemente intensas (BORGES, 1994).

Dentre as diversas aplicações para o método do pó estão:

- Identificação das fases de minerais, cerâmicas, ou outros tipos de materiais em engenharia.
- Identificação de múltiplas fases em misturas cristalinas.
- Identificação e análise estrutural de minerais.
- Reconhecimento de materiais amorfos em estruturas cristalinas.
- Análise da estrutura cristalográfica e cálculo da célula unitária em materiais cristalinos.

- Determinação quantitativa da soma de diferentes fases em misturas pelo cálculo das proporções dos picos.
- Determinação do tamanho do cristalito pelo estudo da simetria dos picos, entre outros (CONNOLY,2005).

Avaliação do Padrão Obtido Através de Medidas de Difração de raios X por pó

3.7.1. Identificação das Fases

A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos. Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de elétrons ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância cristalina, da mesma forma que o padrão difratométrico por ela gerado, como se fosse uma impressão digital.

Um banco de dados contendo informações cristalográficas básicas e algumas propriedades físicas de compostos cristalinos são mantidas e continuamente atualizadas pelo ICDD, International Centre for Diffraction Data, com sede nos EUA e que chamamos de fichas PDF.

Várias estratégias de identificação podem ser empregadas, sendo que a dificuldade de identificação aumenta progressivamente com a elevação do número de fases cristalinas presentes na amostra. Os procedimentos ou estratégias mais comuns de identificação manual são: a busca por compostos e o método Hanawalt (KAHN, 2007).

Na busca por compostos temos um conhecimento inicial e adequado de quais padrões podemos encontrar. Dessa forma, ao encontrar um deles subtraímos o mesmo do espectro e analisamos o espectro residual.

No método Hanawalt não temos, a priori, o conhecimento sobre os padrões que podemos encontrar. Sendo assim, ordenamos os picos de difração por ordem de intensidade. A partir daí tentamos a identificação de um composto. Ao encontrá-lo subtraímos o mesmo do espectro e repetimos o procedimento (Figura 3.7).

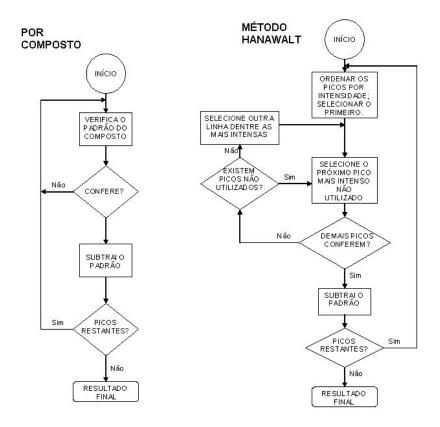


Figura 3.7 - Estratégias de identificação de fases por natureza de composto e pelo método Hanawalt (KAHN, 2007).

A partir da década de 90, com o auxílio de microcomputadores, sistemas automáticos de busca por métodos booleanos e lógica Fuzzy passaram a ser largamente empregados no auxílio à identificação das fases cristalinas por difração de raios X. Nestes procedimentos, três a dez picos mais intensos de cada fase presente no banco de dados são comparados com o difratograma da amostra, atribuindo-se créditos e penalidades para cada pico difratado no que se refere a sua presença/ausência, intensidade difratada e deslocamento da distância interplanar. Ao final do processo de busca e comparação, os valores dos resultados são expressos em ordem decrescente de pontuação, seguindo-se a avaliação final por parte do usuário (KAHN, 2007).

3.7.2. Avaliação das Fases

Um método simples de se avaliar as fases presentes em uma amostra é ajustar gaussianas aos picos de difração. Tomando-se pequenos intervalos, de até quatro picos, faz-se o ajuste repetindo para todos os picos do padrão. Após identificar as fases, calcula-se a área total sob cada pico. Com a soma das áreas de cada pico obtém-se a área total do espectro. Então, temos que a área de uma fase dividida pela área total do espectro representa a proporção da fase identificada na amostra assumindo um erro de 5%, avaliado com base no tipo de átomo e na multiplicidade do plano refletor. Esse procedimento foi validado pela calibração feita e descrita na dissertação de mestrado de Kuplich (2004).

Avaliação dos Parâmetros de Rede do 3.7.3. Cristal

Considerando-se que o padrão do difratograma de um material cristalino é função da sua estrutura cristalina, é possível se determinar os parâmetros de seu reticulado (a, **b**, **c**, α, β e y da célula unitária) desde que se disponha de informações referentes ao sistema cristalino, grupo espacial, índices de Miller (hkl) e respectivas distâncias interplanares dos picos difratados. Este procedimento pode ser efetuado tanto por métodos manuais para cristais de elevada simetria (sistemas cúbico, hexagonal e tetragonal), como mais facilmente a partir de diversos programas de computador, que permitem um rápido processamento para cristais de quaisquer sistemas cristalinos, independentes de sua complexidade (KAHN, 2007).

Dentre vários programas temos o CELREF (LAUGIER, BOCHU), que é um programa de refinamento dos parâmetros de célula do cristal para as difrações de raios X de pó e nêutrons que utiliza o método dos mínimos quadrados não-lineares. Mais detalhes sobre o manuseio do programa podem ser encontrados na dissertação de Azevedo (2002). Os fundamentos de funcionamento do programa CELREF e alguns detalhes são descritos a seguir:

Em um arquivo de entrada os valores teóricos são calculados pelo CELREF a partir dos dados da ficha PDF. Usamos os seguintes dados nesta análise: o comprimento de onda, θ mínimo e θ máximo (intervalo do ângulo de varredura), o código do tipo da rede os códigos de extinção e os dados da rede **a**, **b** e **c** e os ângulos α, β e γ. A partir daí o CELREF gera todos os códigos de extinção do composto.

Em outro arquivo entrada fornecemos a identificação da amostra, o vínculo de refinamento, o número máximo de ciclos de refinamento, o comprimento de onda, origem do zero, os parâmetros de rede os ângulos e seus possíveis refinamentos. Por último uma tabela com as extinções sistemáticas e os ângulos θ observados na medida. Após executar o programa os resultados obtidos no cálculo são armazenados em um arquivo de saída. Neste arquivo encontramos os valores de entrada e os valores finais dos parâmetros fornecidos anteriormente e seus respectivos desvios. Uma tabela com as extinções sistemáticas, os valores para θ observado e calculado e as diferenças entre eles (KUPLICH, 2004).

Referências do Capítulo 3

AZEVEDO, N. E. O. Estudo sobre pedras de rins através da técnica de difração de raios X de pó. 2002. 111f. Dissertação (Mestrado em Física)- Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2002.

BLEICHER L.; SASAKI J. M., Introdução à difração de Raios X em cristais, Publicação da Universidade Federal do Ceará, 2000.

BORGES, F.S. Elementos de cristalografia F.C.Gulbenkian, Lisboa, Segunda edição, 1994.

CALISTER JR, W. D., Materials Science and Engineering, an introduction. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

CONNOLLY, J. R. Introduction to X-Ray Powder Diffraction **EPS400-002**, Spring 2003, 2005.

EISBERG, R.; RESNICK, R. Física Quântica Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas. 18ª Tiragem. Rio de Janeiro: Campus, 1979. cap.2, p.67-68.

EISBERG, R.; RESNICK, R. Física Quântica Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas. 18ª Tiragem. Rio de Janeiro: Campus, 1979. cap.9, p.428.

GAELZER, R., Universidade Federal de Pelotas, 2004. Disponível em: www.minerva.ufpel.edu.br/~rudi/grad/EsMa/Apostila/CapIV.pdf, acesso em: 13 de março de 2008.

KAHN H., Difração de Raios X, Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, disponível em: www.angelfire.com/crazy3/qfl2308, acesso em: 16 de novembro de 2007.

KITTEL, C. Introduction to Solid State Physics. 8th edition USA: John Wiley & Sons, Inc, 2005. cap 1, p.9.

KUPLICH, L. Estudos sobre o CaC2O4.H2O presente em pedras de rins. 2004. Dissertação (Mestrado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004.

LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTRON. Disponível em: www.lnls.br, acesso em 01 de junho de 2009.

LAUGIER, J., BOCHU, B., CELREF - Programme d'affinement des parameters de maille à partir d'un diagramme de poudre, INPG.

NELSON S. A., X-Ray Crystallography, Tulane University New Orleans, LA, EUA, 2003.

PASSAMAI JÚNIOR, J. L. Estudo sobre a valência no Supercondutor Hg,Re -1223 através da técnica de absorção de Raios X, 2005. Dissertação (Mestrado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal o Espírito Santo, Vitória, 2005.

SANTOS, E. M. Modelo sobre tensão residual em materais ortrotópico e transversalmente ortotrópico, 2005. Dissertação (Mestrado em Física) – Programa de Pós- Graduação em Física, Universidade Federal do Espírito Santo, 2005.

TIPLER, P. A.; LLEWELLYN, R. A. Física Moderna. 3.ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2001. cap.3 p.93.

Capítulo 4

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Princípio de Funcionamento do MEV

A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. A forma mais antiga e usual para isto é o uso da lupa seguida do microscópio óptico, cujo princípio de funcionamento (Figura 4.1) é o uso da luz visível ou luz ultravioleta que ilumina o objeto permitindo ampliações de até 2000 vezes. Aumentos maiores são limitados a efeitos de difração devido ao comprimento de onda da radiação incidente, além disso, a profundidade de campo é inversamente proporcional aos aumentos, isso requer que a superfície da amostra seja perfeitamente polida, o que às vezes é inviável dependendo da amostra (KASTEMBACK, 1994).

A limitação dos microscópios ópticos pode ser superada com o uso do microscópio eletrônico de varredura (MEV), que utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz visível ou ultravioleta (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O princípio de funcionamento do MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons (feixe primário) de pequeno diâmetro, a maioria dos instrumentos utilizam como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensão de 1 kV a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e um anodo e seu percurso é definido pelas lentes condensadoras, defletor e focalizado pela lente objetiva até interagir com a amostra. Desta interação são produzidos elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores adequados e convertidos em um sinal de vídeo (Figura 4.1).

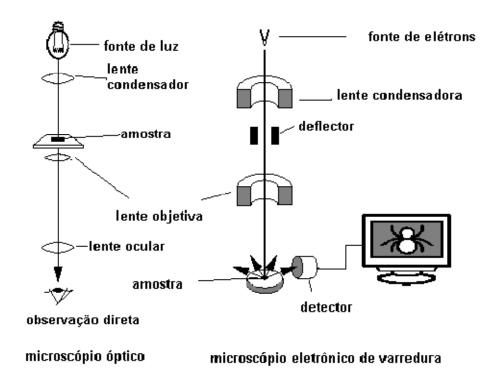


Figura 4.1 - Funcionamento do microscópio óptico e do microscópio eletrônico de varredura (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Quando o feixe primário incide na amostra, parte dos elétrons difunde-se e constitui um volume de interação cuja forma depende principalmente da tensão de aceleração e do número atômico da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007), conforme mostra a Figura 4.2.

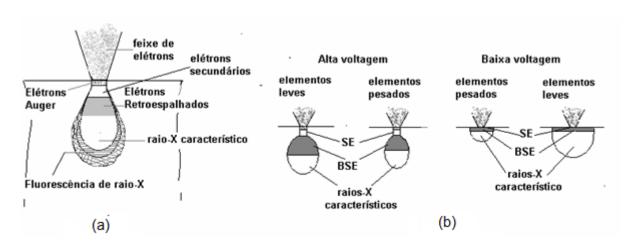


Figura 4.2 - Volume de interação: a) localização dos sinais emitidos pela amostra; b) relação da voltagem para elementos leves e pesados. Figura adaptada de KASTEMBACK, 1994.

Os elétrons e as ondas eletromagnéticas produzidos são utilizados para formar as imagens ou para efetuar análises físico-químicas. Para serem detectadas, as partículas e/ou os raios eletromagnéticos resultantes da interação do feixe eletrônico com a amostra devem retornar à superfície da amostra e daí atingirem o detector. A profundidade máxima de detecção, portanto, a resolução espacial, depende da energia com que estas partículas ou raios atingem o detector, ou são capturadas pelo mesmo. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

4.1.1. **Elétrons Secundários (SE)**

Os elétrons secundários no MEV resultam da interação do feixe eletrônico com o material da amostra. Estes elétrons resultantes são de baixa energia (<50 eV), e formarão imagens com alta resolução (3-5 nm). O contraste na imagem é dado, sobretudo, pelo relevo da amostra, que é o principal modo de formação de imagem no MEV. Os elétrons secundários, ou elétrons de baixa energia, gerados pelas interações elétron-átomo da amostra têm um livre caminho médio de 2 nm a 20 nm, por isso, somente aqueles gerados junto à superfície podem ser reemitidos e, mesmo estes, são muito vulneráveis à absorção pela topografia da superfície.

Elétrons Retroespalhados (BSE) 4.1.2.

Os elétrons retroespalhados, por definição, possuem energia que varia entre 50 eV até o valor da energia do elétron primário. Os elétrons retroespalhados de alta energia, por serem resultantes de uma simples colisão elástica, provêm de camadas mais superficiais da amostra. Logo, se somente este tipo de elétrons forem captados, as informações de profundidade contidas na imagem serão poucas se comparadas com a profundidade de penetração do feixe. O sinal de BSE é resultante das interações ocorridas mais para o interior da amostra e é proveniente de uma região do volume de interação abrangendo um diâmetro maior do que o diâmetro do feixe primário. A imagem gerada por esses elétrons fornece diferentes informações em relação ao contraste que apresentam: além de uma imagem topográfica (contraste em função do relevo), também se obtém uma imagem de composição (contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra).

Outros tipos de interações podem ser obtidos pela incidência do feixe primário na amostra, como segue:

- Elétrons transmitidos: sofrem espalhamento elástico (espalhamento de Rutherford) sendo, então, os responsáveis pela formação da imagem dos MET (microscópios eletrônicos de Transmissão).
- Elétrons absorvidos: perdem toda sua energia na amostra, e, portanto, geram uma corrente elétrica entre a amostra e o porta-amostra, que deverá ser aterrado para descarregá-la e garantir a integridade da mesma.
- Elétrons Auger: estes são os elétrons cuja energia (em torno de 1,5 keV) é característica do elemento que a emite e do tipo de ligação química. Estes elétrons possuem energia máxima de cerca de 2 keV, por isso, pode ser utilizada para análise elementar (principalmente óxidos e filmes muito finos). A profundidade de escape da interação é de aproximadamente 0,2 nm a 2,0 nm, a análise correspondente a este tipo de sinal é chamada espectroscopia Auger (AS).

Microanálise de Raios X 4.2.

A microanálise eletrônica consiste na medida de raios X característicos emitidos de uma região microscópica da amostra bombardeada por um feixe de elétrons. As linhas de raios X característicos são específicas do número atômico da amostra e, o seu comprimento de onda ou sua energia podem ser utilizados para identificar o elemento que está emitindo a radiação. Espectros de raios X podem ser obtidos para todos os elementos da tabela periódica, com exceção do hidrogênio.

Os raios X emitidos da amostra, devido ao bombardeio de elétrons do feixe podem ser detectados pelo espectrômetro convencional de cristais ou pelos dispositivos de estado sólido, silício dopado com lítio. O detector de raios X e o MEV são concepções alternativas de projeto do mesmo instrumento básico, isto é, partem do mesmo princípio físico para resultados diferenciados. O feixe de elétrons é suficientemente energético para ionizar camadas profundas dos átomos e produzir também a emissão de raios X, além da emissão de outras partículas como os elétrons retroespalhados utilizados na formação da imagem. A resolução espacial da análise depende da energia do raio X detectado e da natureza do material. A Figura 4.3 mostra, de forma esquematizada, o processo de excitação de elétrons para produção de raios X. Através da análise dos picos obtidos no espectro podem-se determinar os elementos presentes na amostra, porém, tendo o cuidado de observar se há o aparecimento do pico de ionização do Silício (quando se utiliza o detector de estado sólido). Dois tipos de detectores que captam raios X característicos podem ser utilizados: por dispersão de energia (EDS) ou por dispersão em comprimento de onda (WDS). Sendo o primeiro (EDS), largamente mais utilizado.

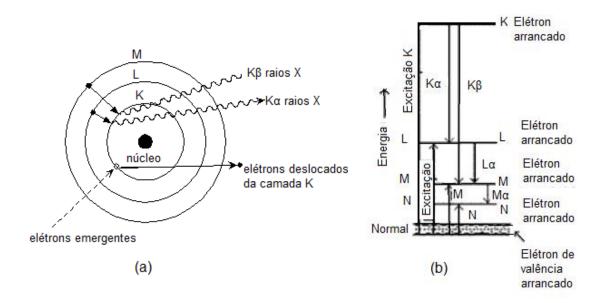


Figura 4.3 - Esquema ilustrativo da emissão de raios X. Adaptado de KASTENBACH,1994.

A técnica de EDS considera o princípio de que a energia de um fóton (E) está relacionada com a frequência eletromagnética (v) pela relação E = hv, onde "h" é a constante de Planck. Fótons com energias correspondentes a todo espectro de raios X atingem o detector de raios X quase que simultaneamente, e o processo de medida é rápido, o que permite analisar os comprimentos de onda de modo simultâneo.

A zona analisada será, portanto, aquela que é percorrida pelo feixe. Se estivermos trabalhando no modo de varredura (formação de uma imagem), então a análise será de toda a superfície da imagem. É possível, também, parar a varredura e analisar em um ponto (spot), área ou linha selecionada na imagem.

O detector é capaz de determinar a energia dos fótons que ele recebe. Fica possível, portanto, traçar um histograma com a abscissa sendo a energia dos fótons (keV) e a ordenada o número de fótons recebidos (contagens). O tempo necessário para adquirir o espectro (Figura 4.4) de boa qualidade fica em torno de 2 minutos.

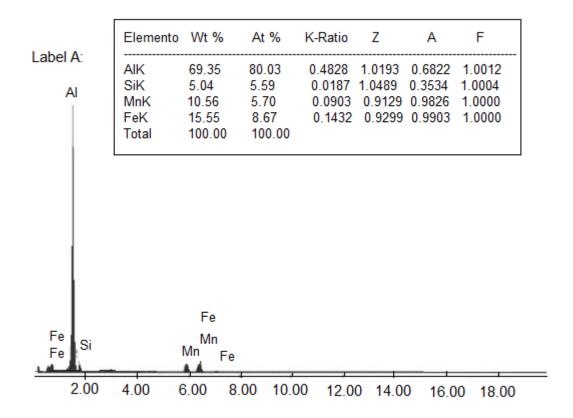


Figura 4.4 - Espectro obtido por microanálise de raios X característicos por EDS com tabela de discriminação dos elementos analisados (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A interpretação dos espectros é facilitada por uma base de dados que contém, para cada elemento, as energias e a intensidade das raias que as produziu. É possível localizar, para cada energia do espectro, a lista dos elementos que possuem uma raia neste domínio energético. Também é possível conhecer, por meio de cálculos mais elaborados, as quantidades respectivas dos diferentes elementos analisados (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Aspectos Quantitativos 4.2.1.

A determinação das porcentagens dos elementos por microanálise de raios X é uma operação possível no microscópio eletrônico. Existem vários métodos para quantificação dos elementos químicos presentes na amostra, sendo o método mais simples o sem padrões, denominado de semiguantitativo. O princípio consiste em avaliar a área integrada associada aos picos que é proporcional à quantidade de átomos que produziu a raia.

A quantificação através do método semiquantitativo consiste, portanto, em medir a área integrada dos picos que se tem previamente identificada atribuindo um coeficiente a mesma e então calcular as porcentagens. As dificuldades para isto são inúmeras: há, infelizmente, além da quantidade, muitos outros parâmetros: tensão de aceleração, natureza dos outros elementos presentes com os quais se faz à quantificação, repartição dos elementos no volume analisado, geometria da superfície analisada.

A análise quantitativa consiste em se obter a concentração a partir de relações de intensidade de raios X da amostra em estudo e de um padrão apropriado. Quando a composição do padrão é próxima da composição da amostra, os efeitos da matriz sobre a intensidade de raios X são insignificantes e a análise se reduz à comparação das intensidades observadas. Entretanto, na maioria dos casos utilizam-se padrões de elementos puros porque é possível caracterizá-los com bastante precisão, mas nestes casos a precisão da análise depende essencialmente do modelo de correção (GOLDSTEIN et al., 1992).

4.3. Preparação das Amostras para a Medida de MEV

Devido à necessidade de interação do feixe eletrônico com a amostra, alguns elétrons são absorvidos pela amostra que deve conduzi-los para o fio terra, por isso, é preciso que as amostras sejam condutoras. Caso isto não ocorra, é possível tornálas condutoras através de vários processos físicos como evaporação ou a deposição de íons (sputtering). Outro motivo para o recobrimento das amostras, é que as camadas depositadas podem melhorar o nível de emissão de elétrons, pois emitem mais elétrons que o material da amostra, facilitando a construção da imagem (GOLDSTEIN et al., 1992).

Geralmente o método mais utilizado é o recobrimento por deposição de íons metálicos de ouro (Au), liga de ouro-paládio (Au-Pd) ou platina (Pt), entre outros. Neste processo, as amostras são colocadas em uma câmara com pressão em torno de 0,1mbar a 0,05 mbar e o alvo metálico é bombardeado com átomos de gás inerte como, por exemplo, argônio. Os átomos do alvo são depositados sobre a amostra. As máquinas utilizadas para esta finalidade são denominadas metalizadoras e oferecem como parâmetros de ajuste: corrente aplicada (em mA), tempo de deposição e altura da amostra em relação ao alvo, a fim de que seja calculada a espessura do metal depositado. No recobrimento a partir da evaporação, normalmente é utilizado o carbono. O revestimento com carbono é usado para recobrir regiões da superfície em que os átomos de ouro não têm cobertura efetiva, uma vez que são átomos maiores; ou ainda, quando não é desejada a incorporação de átomos na superfície como, por exemplo, para análise por raios X para determinação de ouro ou elemento próximo a ele na tabela periódica. O carbono também é recomendado para superfícies com diferenças de altura, pois, pelo método da evaporação, os átomos espalham-se de forma mais uniforme. Fibras de carbono são aquecidas em torno de 2000°C em vácuo e evaporadas sobre a amostra. Para este procedimento utiliza-se a câmara de uma metalizadora a qual é acoplado um sistema para aquecimento das fibras de carbono.

Apesar do carbono não ser um bom emissor de elétrons, este elemento pode fornecer um caminho condutor sobre as amostras mesmo em camadas muito finas. O método de impregnação metálica com OsO₄ é também utilizado para evitar estes efeitos. Os recobrimentos metálicos utilizados por estes procedimentos visam apenas tornar as amostras condutoras de modo a gerar imagens com boa resolução no MEV, portanto, é preciso um controle da espessura depositada a fim de evitar artefatos na imagem que podem mascarar a superfície real da amostra.

Amostras metálicas podem ser observadas sem recobrimento, desde que a faixa de tensão usada no microscópio seja apropriada para o material em estudo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Referências do Capítulo 4

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura Aplicações e preparação de amostras Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores Edição do CEMM - Centro de Microscopia e Microanálises do IDÉIAPUCRS - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007, p. 11-13.

GOLDSTEIN J.I.; NEWBURY D. E.; ECHIL P; JOY DC; ROMIG JR, A. D.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York: Plenum Press; 1992.

KASTEMBACK, H.; BOTA FIILHO, W. J. Microscopia Eletrônica de Transição e Varredura. São Paulo: Associação Brasileira de Metais, 1994.

Capítulo 5

5. Metodologia Experimental

5.1. Coleta e Registro das Amostras

A pesquisa foi divulgada nos meios de comunicação local afim de conseguir doação de amostras para a pesquisa. As pessoas que já sofreram ou iriam sofrer colecistectomia interessadas em doar as pedras retiradas da vesícula entraram com contato com o grupo de pesquisa e a coleta dessas amostras foi feita na residência do doador.

Ao todo foram coletadas 49 amostras de ambos os sexos. Cada uma dessas amostras recebeu um código de identificação ex: V01.

Ao receber o código, a amostra foi colocada em um dissecador por um período de 48 a 72 horas. Imagens das amostras foram registradas através de fotografias ópticas em uma câmera digital.

As amostras foram caracterizadas sob o ponto de vista morfológico. Na caracterização, foi possível observar vários detalhes das amostras como: cor, tamanho, geometria, aspecto da superfície externa da amostra, o interior da amostra e variação da coloração do interior da amostra.

Neste trabalho propomos uma classificação morfológica para as pedras de vesícula em :

- 1. Ovais:
- Geométricas (piramidais, tetraédricas e octaédricas);

3. Irregulares.

Para completar o registro, a massa de cada amostra foi determinada através de uma balança analítica.

Em seguida as amostras foram preparadas para medidas de difração de raios X por pó e de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Preparação das Amostras e Medidas de Difração de raios X por Pó

Antes da medida de difração de raios X por pó as amostras passaram por um processo de preparação. Elas foram muidas manualmente em grau e pistilo de ágata. O processo de moagem foi realizado de forma particular e detalhado, de acordo com as características de cada amostra. Algumas amostras possuíam pedras com diferentes colorações em seu interior, ou possuíam pedras com geometrias diferentes. Quando possível essas partes foram separadas antes da moagem e receberam um subcódigo. A seguir descreve-se o processo de preparação de algumas amostras para facilitar o entendimento do leitor.

A amostra V38 foi separada em três partes, casca, borda e núcleo, que foram moídas separadamente. O pó de cada parte recebeu um subcódigo: V38-01 para o núcleo, V38-02 para a borda e V38-03 para a casca.

A amostra V41 apresentava um pó fixado em seu exterior, foi feita a moagem do pó exterior que recebeu o subcódigo V41-01 e foi feita a moagem do interior da amostra que recebeu o subcódigo V41-02.

A amostra V45 possuía várias pedras piramidais e uma pedra no formato oval. Sendo assim, as pedras foram moídas separadamente. O formato oval recebeu o subcódigo V45-01 e o formato piramidal recebeu o subcódigo V45-02.

Após o processo de moagem, o pó foi peneirado em uma peneira com 53 µm de malha, garantindo uma granulometria uniforme, contribuindo para uma boa medida de difração de raios X por pó.

As medidas de difração de raios X por pó foram realizadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

As medidas realizadas no IPEN foram feitas em um difratômetro da marca Rigaku, com geometria Bragg-Bretano utilizando um tubo de cromo (λ = 2.29092 Å), trabalhando com uma tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, utilizou-se um monocromador de grafite e um contador de cintilação. O ângulo de varredura das medidas foi de θ_{min} = 2° a $\theta_{máx}$ = 60° com passo de 0,02°.

As amostras medidas no IPEN foram: V01, V02, V04, V05, V07, V08, V09, V10, V14, V15, V17 e V38.

As medidas realizadas no LNLS foram feitas na linha de luz X-ray Powder Diffraction (D10B-XPD), Figura 5.1. Esta linha opera na faixa de raios X e é mais utilizada para o estudo de estruturas mono e policristalinas através da técnica de difração de pó por alta resolução (FERREIRA et al., 2006).

Utilizou-se um goniômetro com geometria Bragg-Bretano, a radiação foi selecionada por um monocromador de cristal duplo de silício (111), onde o primeiro cristal é refrigerado e o segundo cristal curvado sagital (GILES et al., 2003) e o detector com contador de cintilação Na(TI)I.



Figura 5.1- Linha de luz XPD (FERREIRA et al.,2006).

Na Tabela 5.1 encontram-se as amostras que foram medidas no LNLS, o comprimento de onda, o ângulo de varredura e o passo utilizado nas medidas.

Tabela 5.1 – Medidas realizadas no LNLS.

λ = 1,90782 Å varredura: 2°-100°	λ = 1,7898 Å varredura: 2°-30°		= 2,0836 <i> </i> redura: 2°-	
passo: 0,02°	passo: 0,01°	р	asso: 0,01	0
V16	V03	V21	V37	V47
	V06	V24	V39	V48
	V11	V25	V40	V49
	V12	V26	V41	V50
	V19	V28	V42	V51
	V20	V32	V43	V52
	V22	V33	V44	V53
	V23	V34	V45	V54
	V27	V35	V46	V55

Identificação e Avaliação das **5.3. Fases** através das Medidas de Difração de Raios X por Pó

O reconhecimento das fases presentes em cada pico de difração foi feito comparando-se as distâncias interplanares e intensidades das fichas PDF com as distâncias interplanares e intensidades encontradas na medida do padrão de difração de cada amostra. A ficha PDF utilizada para uma primeira análise foi a ficha de número 07-0742 do colesterol (C₂₇H₄₆O).

A avaliação das fases foi feita utilizando o mesmo método de Kuplich (2004), descrito no item 3.7.2. Calculamos a proporção de uma fase dividindo a área dessa fase pela área total do difratograma.

5.4. Refinamento dos Parâmetros de Rede

Neste trabalho foi estudada a evolução dos parâmetros de rede a, b e c dos cristais de colesterol presente nas amostras.

Os refinamentos dos parâmetros de rede foram feitos com o programa CELREF (LAUGIER; BOCHU), detalhado no item 3.7.3. Para realizar o refinamento, utilizamos os dados da ficha PDF 07-0742 do colesterol.

5.5. Preparação e Medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura

Após uma pré-análise das medidas de difração de raios X por pó, foi encontrada uma alta porcentagem de colesterol para a maioria das amostras, porém, algumas amostras apresentaram uma alta porcentagem de compostos que não foram identificados apenas com as medidas de difração de raios X por pó.

Nas amostras que possuíam uma porcentagem significativa de compostos não identificados foram feitas medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As amostras selecionadas foram: V16, V40, V41 e V45-01 classificadas como pedras ovais, V38 e V43 que foram classificadas como pedras geométricas e a amostra V54 que foi classificada como pedra irregular.

Nas medidas de microscopia estava-se interessado em analisar a composição das amostras. Para isso foram feitas imagens com o sinal dos elétrons retroespalhados que fornecem um contraste de composição e através de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), identificou-se os elementos químicos presentes na amostra.

Foram feitas também imagens de topografia apenas da amostra V16 através do sinal dos elétrons secundários.

Para se avaliar composição através do MEV, é melhor que a amostra esteja polida. Então, as amostras escolhidas para as medidas de microscopia tiveram que ser preparadas. O processo de preparação é descrito a seguir:

As amostras foram embutidas em resina acrílico polimerizante de modo que sua superfície ficasse preservada, e posteriormente seccionadas ao meio com um disco de diamante de 1mm de espessura. As superfícies obtidas foram desbastadas e polidas parcialmente através do uso de uma lixa de granolumetria 320 e posteriormente uma lixa de granulometria 600.

As superfícies das amostras foram recobertas com um filme metálico produzido pelo sistema EMITECH K 550X com um alvo de ouro-platina.

Após a preparação as amostras foram medidas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Zeiss, modelo EVO 40, utilizando uma voltagem de 20 kV e corrente elétrica variável.

O processo de metalização e as medidas, foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Superfície de materiais (LCSM), situado no Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Espírito Santo.

Referências do Capítulo 5

KUPLICH, L. Estudos sobre o CaC2O4.H2O presente em pedras de rins. 2004. Dissertação (Mestrado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004.

LAUGIER, J., BOCHU, B., CELREF – *Programme d'affinement des parameters de maille à partir d'un diagramme de poudre*, INPG.

Capítulo 6

6. Resultados

Através da proposta de classificação morfológica, construiu-se a Tabela 6.1 que sumariza os resultados expressivos da pesquisa.

Tabela 6.1 - Classificação das amostras de acordo com a morfologia.

	Oval		Geométrica	Irregular
V01	V21	V42	V04	V03
V02	V22	V45	V05	V24
V06	V25	V46	V08	V50
V07	V26	V47	V12	V51
V09	V28	V48	V14	V54
V10	V32	V49	V23	V55
V11	V34	V52	V27	
V15	V35	V53	V33	
V16	V37		V38	
V17	V39		V43	
V19	V40		V44	
V20	V41		V45	

A Figura 6.1 mostra a distribuição percentual da classificação das amostras.

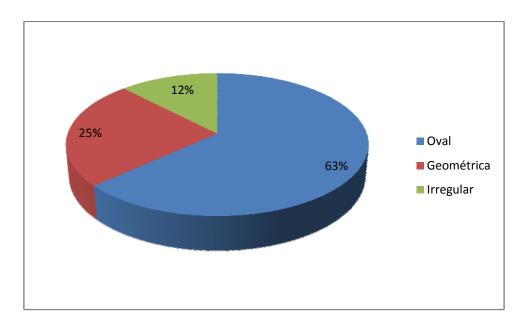


Figura 6.1 - Percentual das classes das amostras.

Pode-se perceber através da Figura 6.1 que as pedras classificadas como ovais apresentaram maior incidência no Estado do Espírito Santo.

Com a medida de difração de raios X por pó obteve-se os resultados da Tabela 6.2. Ressaltando que a incerteza no cálculo da porcentagem de fase é de 5%, devido ao método utilizado para calculá-la.

Tabela 6.2 - Porcentagem de fase.

Amostra	(%) Colesterol	(%) outros compostos
V01-1	96	4
V01-2	100	0
V02-1	90	10
V02-2	97	3
V03	99	>1
V04	97	3
V05	99	1
V06	99	>1
V07-1	94	6
V07-2	96	4
V08	100	0
V09-1	99	1
V09-2	93	7

Amostra	(%) Colesterol	(%) outros compostos
V10	100	0
V11	99	>1
V12	93	7
V14-1	41	59
V14-2	96	4
V15	99	1
V16	58	42
V17-1	85	15
V17-2	100	0
V19-1	98	2
V19-2	99	1
V20	99	>1
V21	0	100 ⁴
V22	99	>1
V23	99	>1
V24	0	100 ⁴
V25-01	0	100 ⁴
V25-02	99	1
V26	99	>1
V27-1	99	1
V27-2	99	1
V28	99	>1
V32	98	2
V33	97	3
V34	97	3
V35-1	99	1
V35-2	99	1
V37	97	3
V38-1	60	40
V38-2	57	43

⁴ Acreditamos que essas amostras podem ser de pedras pigmentares.

Amostra	(%) Colesterol	(%) outros compostos
V38-3	64	36
V39	98	2
V40	58	42
V41-1	59	41
V41-2	58	42
V42-1	98	2
V42-2	99	1
V43	57	43
V44	98	2
V45-01	57	43
V45-02	53	47
V46	98	2
V47	0	100 ⁴
V48	98	2
V49-01	97	3
V49-02	99	1
V50	99	1
V51	95	5
V52	98	2
V53	98	2
V54	29	71
V55	99	1

Os resultados da Tabela 6.2 mostram que o colesterol é a fase majoritária encontrada nas amostras, mas há ainda outros compostos que não puderam ser identificados apenas com a técnica de difração de raios X por pó.

O refinamento dos parâmetros de rede a, b e c dos cristais de colesterol presente nas amostras mostrou que a, b e c estão próximos dos valores de referência encontrados na ficha PDF 07-0742, a saber: **a** = 14,10 Å, **b** = 33,75 Å e **c** = 10,46 Å. A oscilação desses valores pode estar associada ao número de picos fornecidos para o refinamento, que em algumas amostras foi pequeno devido ao ângulo de varredura das medidas de difração de raios X dessas amostras. Os resultados encontram-se na Figura 6.2, Figura 6.3 e Figura 6.4.

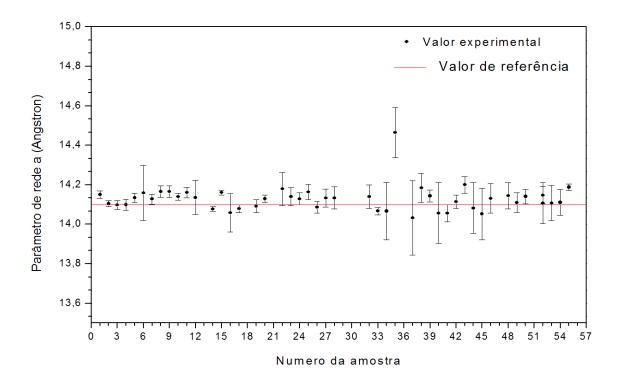


Figura 6.2 - Evolução do parâmetro de rede a.

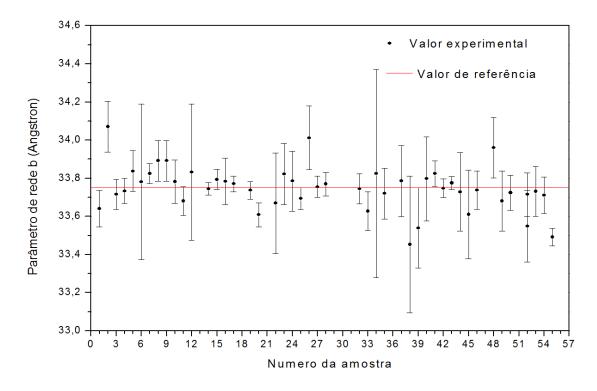


Figura 6.3 - Evolução do parâmetro de rede b.

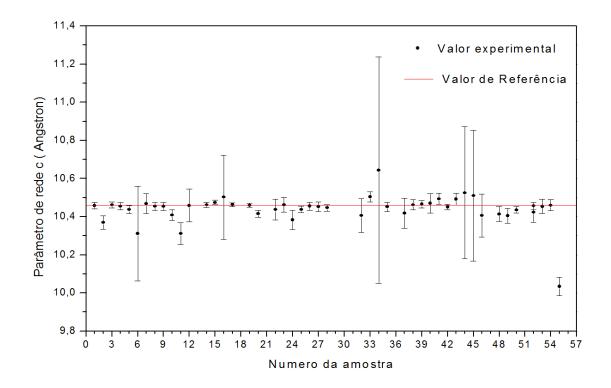


Figura 6.4 - Evolução do parâmetro de rede c.

A seguir estão expostos os resultados obtidos para as 7 amostras analisadas por difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura. Primeiro apresenta-se o resultados para as amostras ovais (V16, V40, V41 e V45), seguido das amostras geométricas (V38 e V43) e por fim da amostra irregular (V54).



Figura 6.5 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V16.

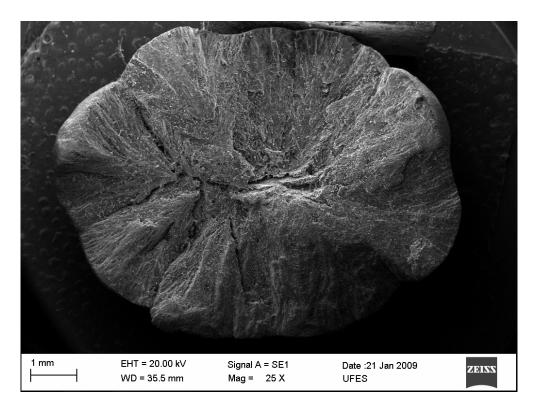


Figura 6.6 - Imagem da topografia da amostra V16 (fraturada) ampliada 25 vezes obtida através de MEV utilizando o sinal SE.

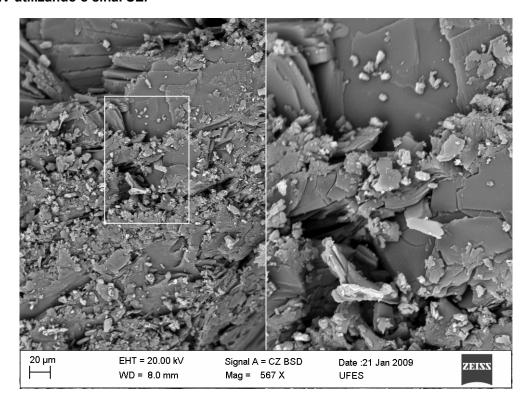


Figura 6.7- Imagem obtida da topografia da amostra V16 (fraturada) ampliada 600 vezes através de MEV utilizando o sinal BSD.

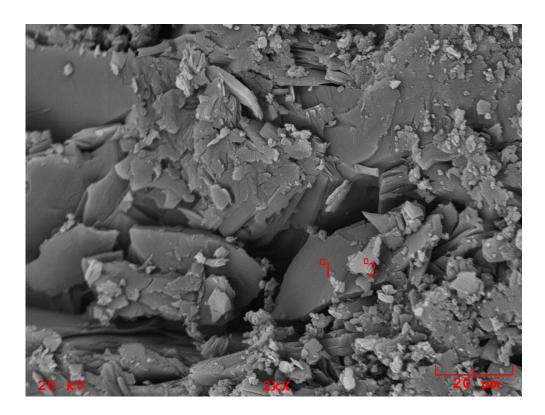


Figura 6.8 - Imagem da amostra V16 (fraturada) ampliada 2000 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV com o sinal BSD.

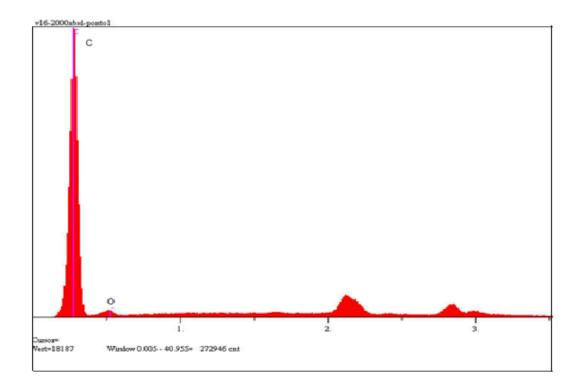


Figura 6.9 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.8.

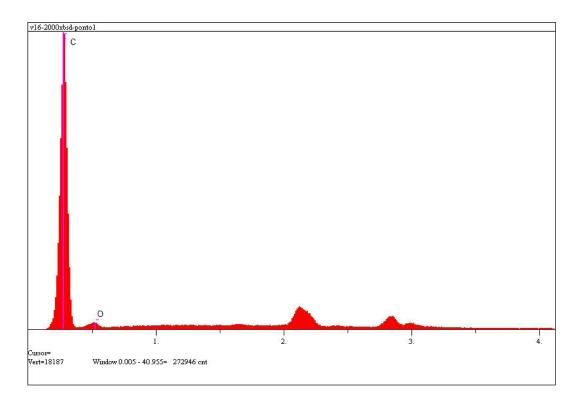


Figura 6.10 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.8.

Tabela 6.3 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V16 referente aos pontos 1 e 2 da Figura 6.8.

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc		
C	Ka	1,019.04	6384	84.545	wt.%		С	Ka	1,048.51	6.476	84 579	wt.%	
0	Ka	26.67	1.033	15.455	wt.%		0	Ka	27.34	1.046	15.421	wt.%	
				100,000	wt.%	Total					100,000	wt.%	Total
kV		20.0					kV		20.0				
Take	off Angl	e 35.0°					Take	off Ang	le 35.0°				
Elap	sed Liv	etime 100.0					Elap	sed Liv	etime 100.0				
	(a)	Ponto	1				(t	o) F	Ponto 2				

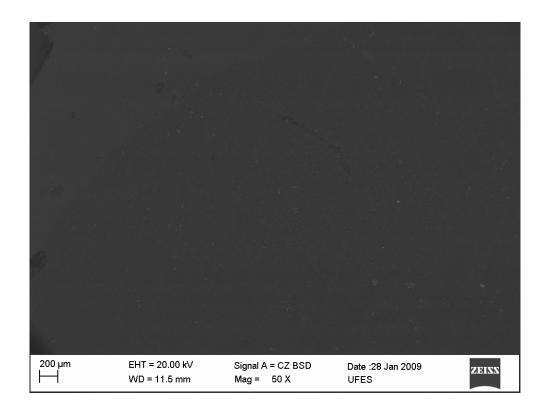


Figura 6.11 – Imagem da amostra V16 (polida) ampliada 50 vezes obtida com MEV utilizando o sinal BSD.

Pode-se notar através da Figura 6.8 que a amostra V16 aparentemente apresenta ter duas fases diferentes para as regiões 1 e 2 devido a diferença de contraste apresentada por essas regiões. Mas o espectro obtido por EDS na Figura 6.9 e Figura 6.10 revelou que ambas as regiões apresentam os mesmos elementos carbono e oxigênio. Os outros picos onde não se tem identificação são os picos do ouro que aparecem devido ao processo de metalização.

Já a Figura 6.11 é uma imagem da amostra V16 polida, nela não foram observados nenhum contraste indicando fases diferentes na amostra.

Por esse motivo é melhor que as amostras estejam polidas quando se quer fazer uma avaliação das fases através do MEV.

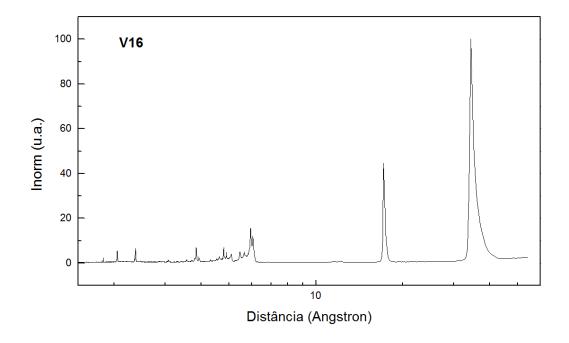


Figura 6.12 – Padrão de difração obtido para a amostra V16 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.



Figura 6.13 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V40.

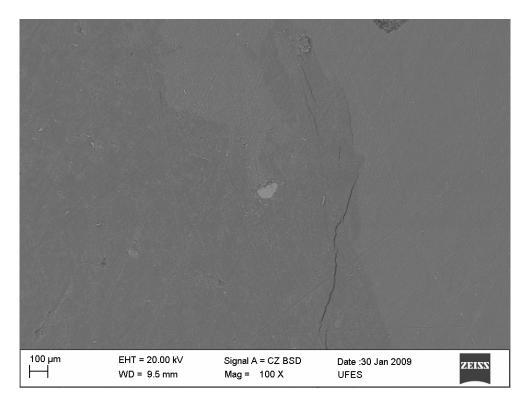


Figura 6.14 - Imagem da amostra V40 (polida) ampliada 100 vezes obtida com MEV utilizando o sinal BSD.

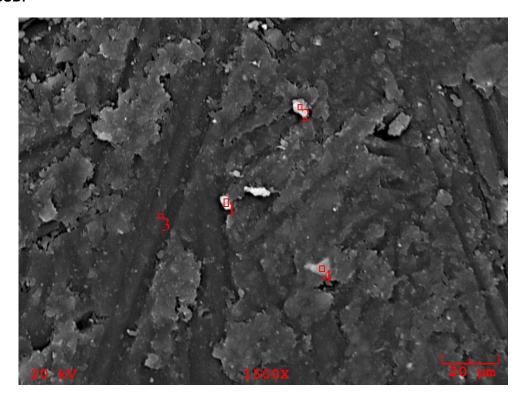


Figura 6.15- Imagem da amostra V40 (polida) ampliada 1500 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1, 2, 3 e 4 obtida através do MEV com o sinal BSD.

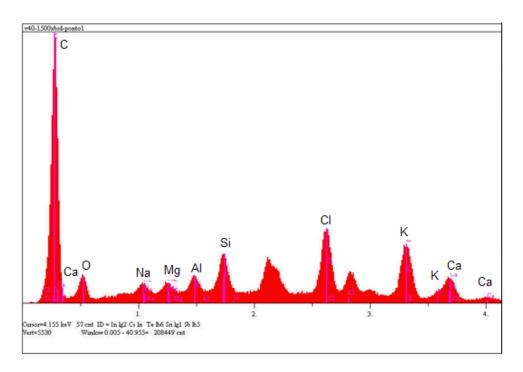


Figura 6.16 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.15.

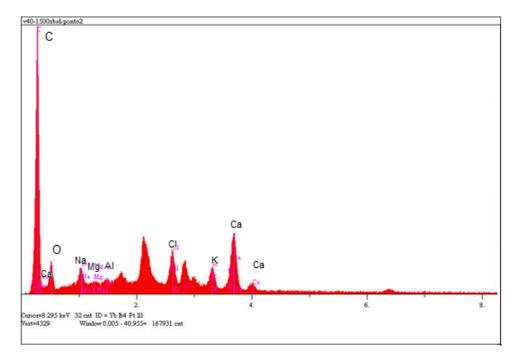


Figura 6.17 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.15.

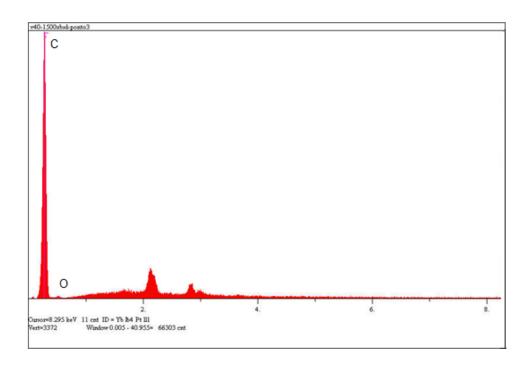


Figura 6.18 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado na Figura 6.15.

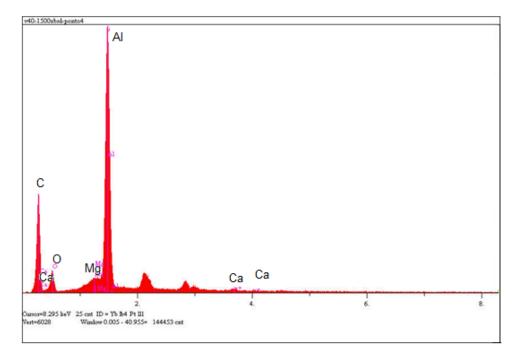
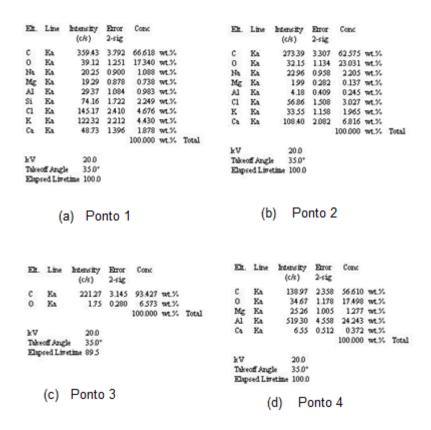


Figura 6.19 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 4 mostrado na Figura 6.15.

Tabela 6.4 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V40 referente aos pontos 1, 2, 3 e 4 da Figura 6.15.



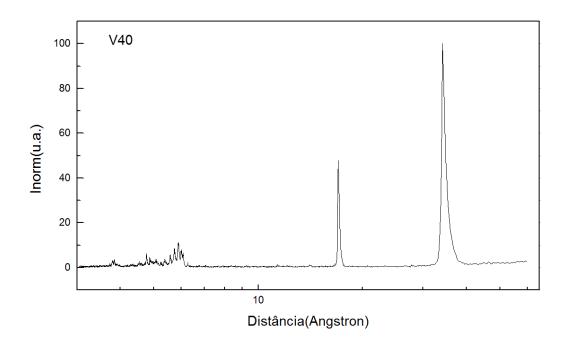


Figura 6.20 - Padrão de difração obtido para a amostra V40 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.



Figura 6.21 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V41.

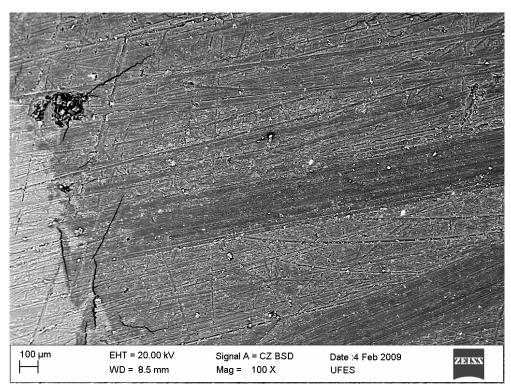


Figura 6.22 - Imagem da amostra V41 (polida) ampliada 100 vezes obtida com MEV utilizando o sinal BSD.

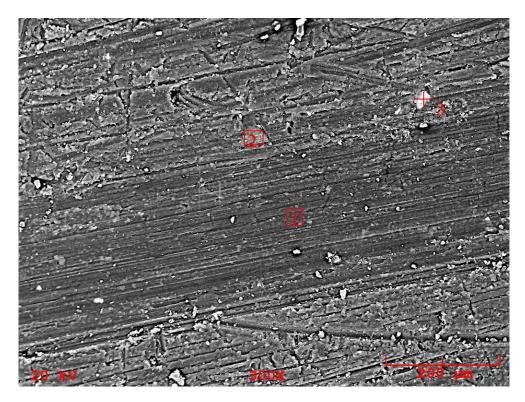


Figura 6.23 - Imagem da amostra V41 (polida) ampliada 100 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1, 2 e 3 obtida através do MEV com o sinal BSD.

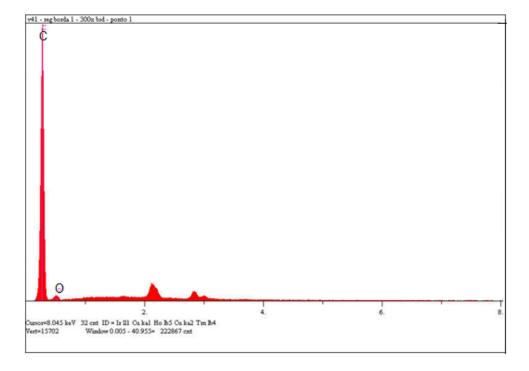


Figura 6.24 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.23.

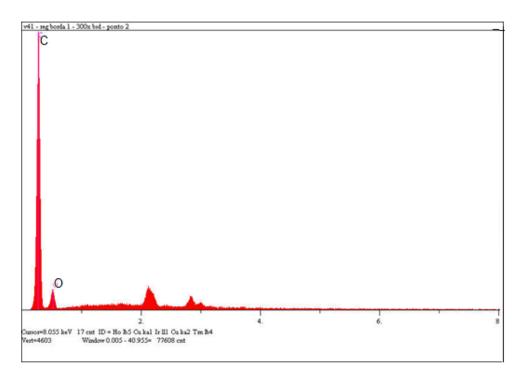


Figura 6.25 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.23.

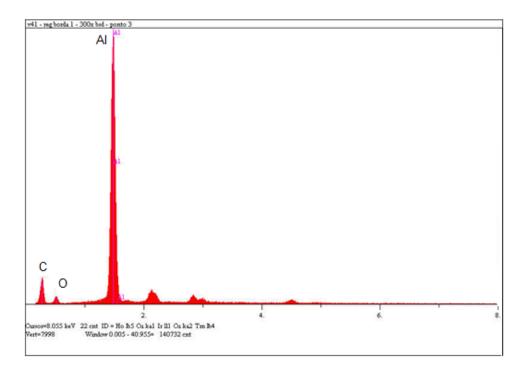


Figura 6.26 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado na Figura 6.23.

Tabela 6.5 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V41 referente aos pontos 1, 2 e 3 da Figura 6.23.

Elt	Line	htersity (c/s)	Error 2-sig	Conc		ER.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Er.	Line	Intensity (c/s)		Conc		
0	Ka Ka	1,006.51 26.24	6.974 1.126		WL%.	c o	Ka Ka	794.05 72.23	10 212 3 080		W1.74	Total	C O Al	Ka Ka	74.33 22.63 1,122.04	2.173 1.199 8.443	9.690	wt.%	
	off Angl sed Lin	20.0 e 35.0° etime 82.8					off Angl sed Liv	20.0 le 35.0° etime 30.5					kV Take	off Ang	20.0		100.000		Total
	(a)	Pont	o 1				(b)	Ponto	2					(c)	Ponto	3			

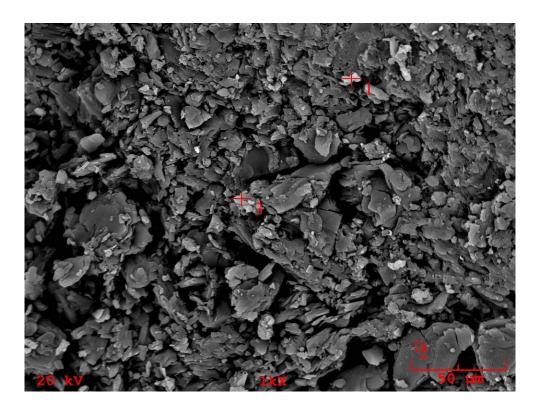


Figura 6.27 - Imagem da amostra V41 (polida) ampliada 1000 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1, 2 e 3 obtida através do MEV com o sinal BSD.

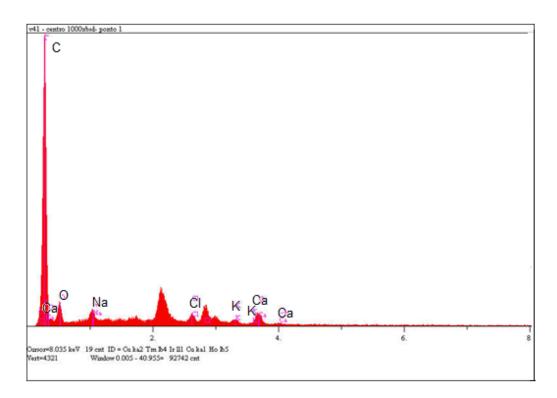


Figura 6.28 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.27.

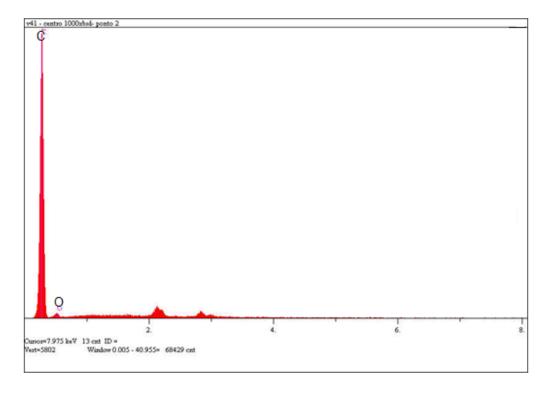


Figura 6.29 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.27.

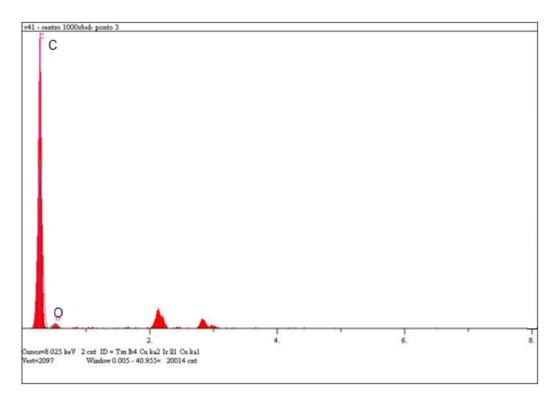


Figura 6.30 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado na Figura 6.27.

Tabela 6.6 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V41 referente aos pontos 1, 2 e 3 da Figura 6.27.

Elt.	Line	htersity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Dt.	Line	htensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	htersity (c/s)	Error 2-sig	Conc		
0	Ka Ka	465.67 42.13	5.890 1.772		WL%		c o	Ka Ka	646.87 12.14	7.415 1.016	12.458	WL%		C	Ka Ka	21.74 0.62	0.405 0.068	16329	wt.%	
Na Mg	Ka Ka	26.54 3.81	0.533	0 228							100,000	wt%	Total					100,000	WL%	Total
C1 K	Ka Ka	20.52 10.81	1237	0.558			kV		20.0 le 35.0°					kV	off Ang	20.0 le 35.0°				
Ca	Ka	36.60	1651		WL%	Total		off Ang sed Liv	etime 47.1							etime 531.2				
kV Take	off Angle	20.0 35.0°																		
Elap	sed Live	time 53.7																		
	(a) Por	nto 1					(b)	Ponto	2					(c)	Ponto	3			

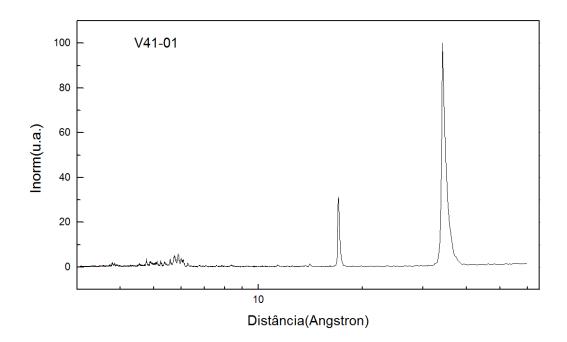


Figura 6.31 - Padrão de difração obtido para a amostra V41-01 (pó) utilizando a técnica de difração de raios X por pó.

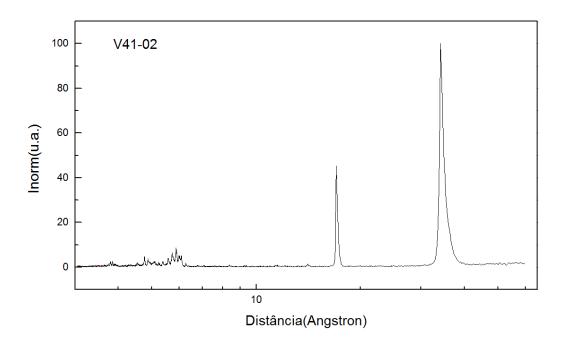


Figura 6.32 - Padrão de difração obtido para a amostra V41-02 (interior) utilizando a técnica de difração de raios X por pó.



Figura 6.33- Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V45.

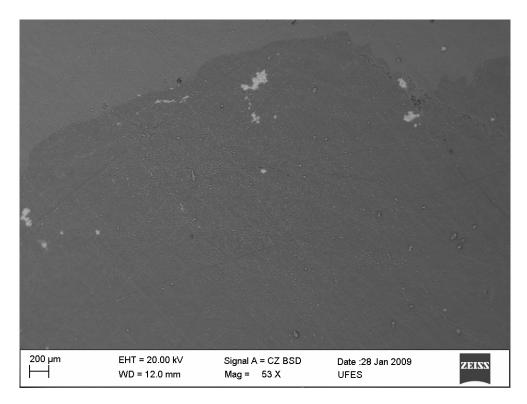


Figura 6.34 - Imagem da amostra V45-01 (polida) ampliada 53 vezes obtida com MEV utilizando o sinal BSD.

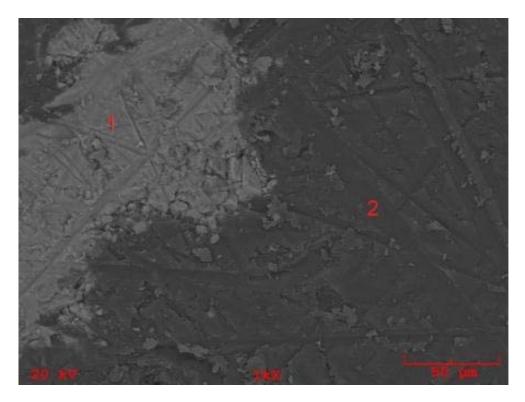


Figura 6.35 - Imagem da amostra V45-01 (polida) ampliada 1000 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV com o sinal BSD.

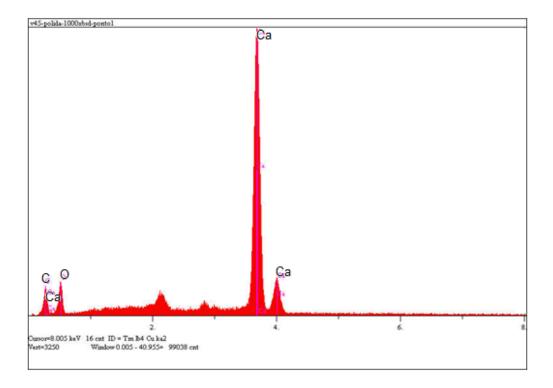


Figura 6.36 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.35.

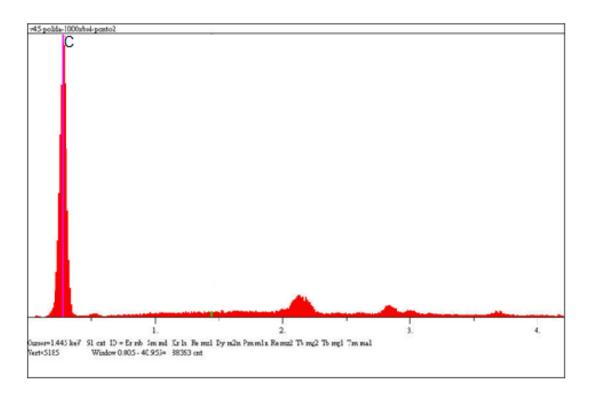


Figura 6.37 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.35.

Tabela 6.7 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V45-01 referente aos pontos 1 e 2 da Figura 6.35.

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc		
C	Ka	2136	0.924	9.545	wt.%		C	Ka	277.92	3 3 3 4	89.730	wt.%	
0	Ka	25.71	1.014	41.848	wt.%		0	Ka	3 3 9	0.368	7.770	wt.%	
Ca	Ka	374.23	3.869	48.607	wt.%		P	Ka	10.43	0.646	1.289	wt.%	
				100,000	wt.%	Total	Ca	Ka	7.90	0.562	1211	wt.%	
											100,000	wt.%	Total
kV		20.0											
Take	off Ang	le 35.0°					kV		20.0				
Elap	sed Liv	etime 100.0					Take	off Angl					
								_	etime 100.0				
(a) F	onto 1						(b)	Ponto 2				

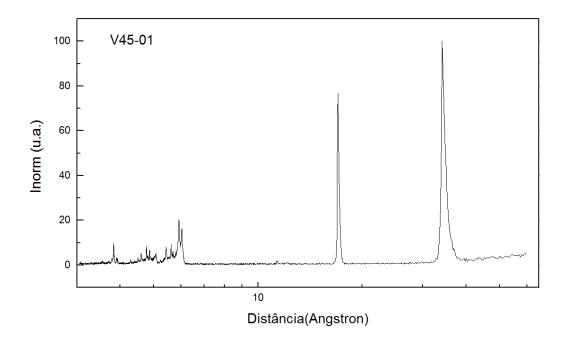


Figura 6.38 - Padrão de difração obtido para a amostra V45-01 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.

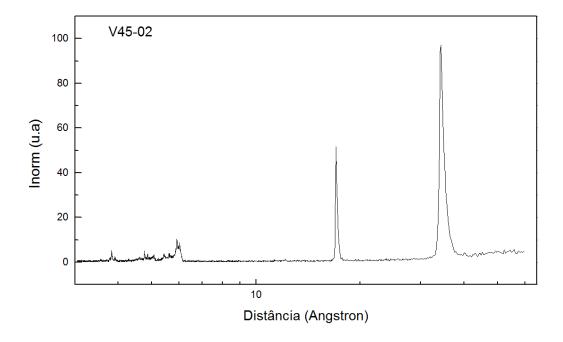


Figura 6.39 - Padrão de difração obtido para a amostra V45-02 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.



Figura 6.40 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V38.

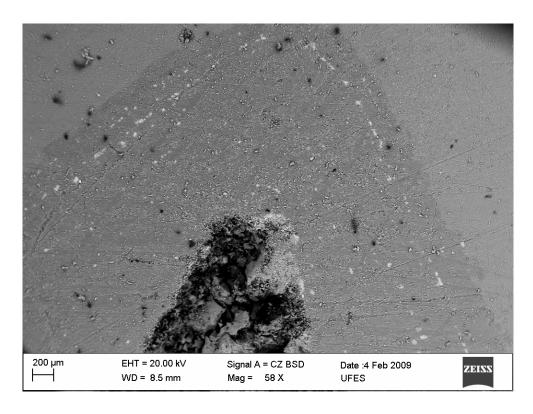


Figura 6.41 - Imagem obtida da amostra V38 (polida) aumentada 58 vezes através de MEV utilizando o sinal BSD.

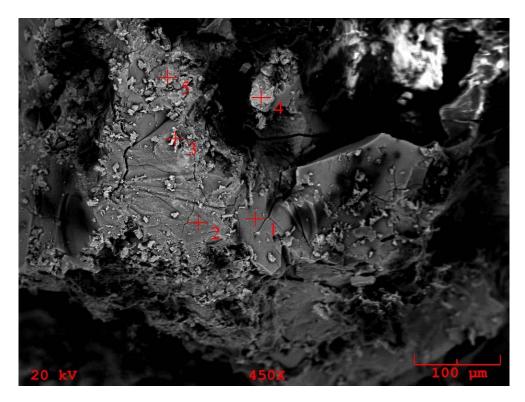


Figura 6.42 - Imagem da região do centro da amostra V38 (polida) ampliada 450 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1, 2, 3 4 e 5 obtida através do MEV com o sinal BSD.

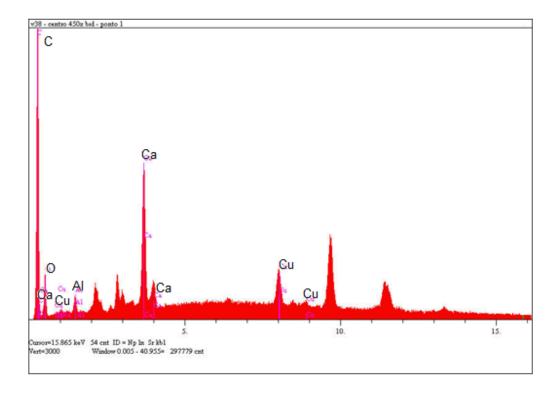


Figura 6.43 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.42.

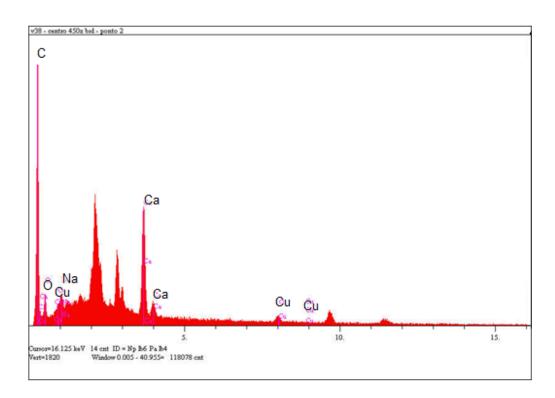


Figura 6.44 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.42.

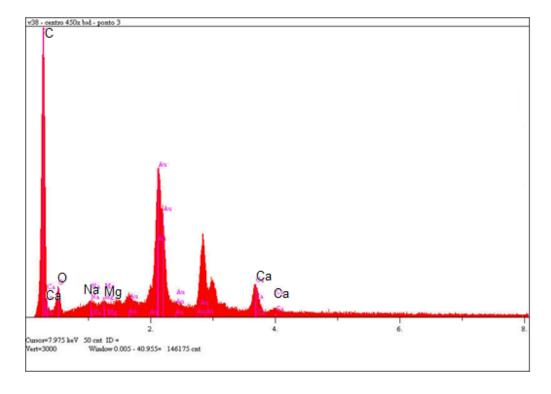


Figura 6.45 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado na Figura 6.42.

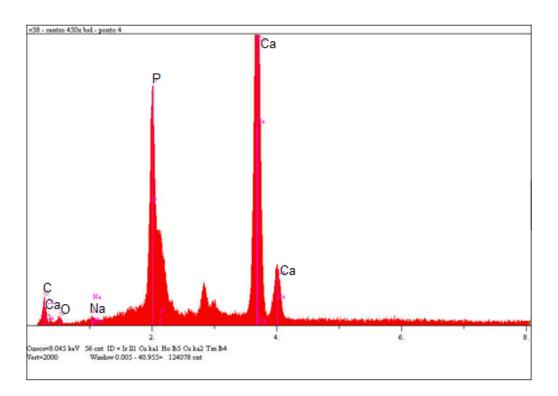


Figura 6.46 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 4 mostrado na Figura 6.42.

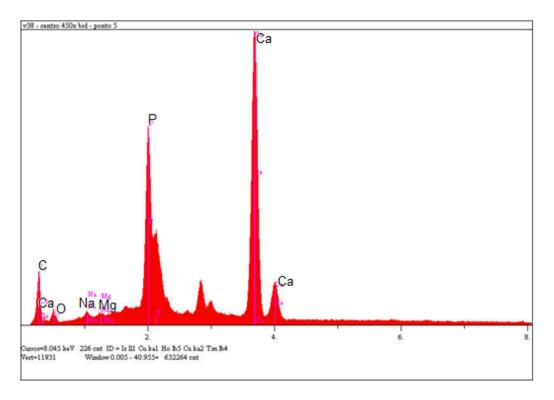


Figura 6.47 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 5 mostrado na Figura 6.42.

Tabela 6.8 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V38 (região do centro) referente aos pontos 1, 2, 3, 4 e 5 da Figura 6.42.

	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc		Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc		
C	Ka	184 98	2.426	54 354	WL%		С	Ka	152.40	2.929	56.667 wt.5	2	С	Ka	327.02	4.777	68.461	me 97	
0	Ka	25.15	0.895	20.079	wt.%		ŏ	Ka	16.07	0951	22.536 wt.1		Ö	Ka	33.86	1.537	29.860		
Na	Ka	3.27	0.323	0.490	wt.%		Na	Ka	12.78	0.848	2.612 wt.		Na	Ka	8.43	0.767		WL%	
A1	Ka	12.75	0.637	1.104	wt.%		Cl	Ka	3.74	0.459	0.393 wt.		Mg	Ka	491	0.707		WL%	
Ca	Ka	148.44	2.174	11.632	wt.%		K	Ka	1.41	0.282	0.153 wt.5		Turk	174	491	0303	100,000		Total
Cu	Ka	47.27	1227	12341	wt.%		Ca	Ka	118.63	2.584	14317 wt.5						100,000	WL.70	1001
				100,000	WL%	Total	Cu	Ka	8.18	0.679	3323 wt.		kV		20.0				
									0.20		100,000 wt.			off Ang					
kV		20.0										7.000			etime 573				
Taked	of Angle	35.0°					kV		20.0				- Ling	sed LIM	emme 5/5				
Еlaps	ed Livet	ime 125.7						off Ang											
									etime 71.1										
(a)	FU	nto 1					(b) F	One	<i>3</i>				(c)		onto 3				
Elt	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig				Elt	Line			Conc								
									(c/s)	2-sig									
C	Ka	10.94	0.823		2 wt.%	ž.	С	Ka	48.27	0.856									
C	Ka Ka	10.94 5.00		3 1190	2 wt.% 1 wt.%		0	Ka	48.27 15.48	0.856 0.485	15378 wt	%							
			0.556	3 1190: 5 8.89			O Na	Ka Ka	48.27 15.48 7.94	0.856 0.485 0.347	15378 wt 0.893 wt	% %							
0	Ka	5.00	0.556	3 1190: 5 8.89 5 0.60	1 wt.%		O Na Mg	Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21	0.856 0.485 0.347 0.220	15378 wt 0.893 wt 0.251 wt	%. %. %.							
O Na	Ka Ka	5.00 3.35 259.07	0.556	3 11.90: 5 8.89 5 0.60 5 23.28:	1 wt.% 1 wt.%		O Na Mg P	Ka Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21 3 10 36	0.856 0.485 0.347 0.220 2.170	15378 wt. 0.893 wt. 0.251 wt. 17.974 wt.	y. y. y. y.							
O Na P	Ka Ka Ka	5.00 3.35 259.07	0.556 0.453 4.006	3 11.90: 5 8.89 5 0.60 5 23.28: 4 55.32	1 wt.% 1 wt.% 2 wt.%		O Na Mg	Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21	0.856 0.485 0.347 0.220 2.170	15378 wt 0.893 wt 0.251 wt 17.974 wt 37.521 wt	y. y. y. y. y.							
O Na P	Ka Ka Ka	5.00 3.35 259.07	0.556 0.453 4.006	3 11.90: 5 8.89 5 0.60 5 23.28: 4 55.32	1 wt.% 1 wt.% 2 wt.% 4 wt.%		O Na Mg P	Ka Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21 3 10 36	0.856 0.485 0.347 0.220 2.170	15378 wt. 0.893 wt. 0.251 wt. 17.974 wt.	y. y. y. y. y.							
O Na P	Ka Ka Ka Ka	5.00 3.35 259.07	0.556 0.453 4.006	3 11.90: 5 8.89 5 0.60 5 23.28: 4 55.32	1 wt.% 1 wt.% 2 wt.% 4 wt.%		O Na Mg P Ca	Ka Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21 310 36 520 78	0.856 0.485 0.347 0.220 2.170	15378 wt 0.893 wt 0.251 wt 17.974 wt 37.521 wt	y. y. y. y. y.							
O Na P Ca	Ka Ka Ka Ka	5.00 3.35 259.07 490.79 20.0	0.556 5 0.453 7 4.006 9 5.514	3 11.90: 5 8.89 5 0.60 5 23.28: 4 55.32	1 wt.% 1 wt.% 2 wt.% 4 wt.%		O Na Mg P Ca	Ka Ka Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21 310 36 520 78	0.856 0.485 0.347 0.220 2.170 2.811	15378 wt 0.893 wt 0.251 wt 17.974 wt 37.521 wt	y. y. y. y. y.							
O Na P Ca kV Tab	Ka Ka Ka Ka	5.00 3.35 259.07 490.79 20.0	0.556 5 0.453 7 4.006 9 5.514	3 11.90: 5 8.89 5 0.60 5 23.28: 4 55.32	1 wt.% 1 wt.% 2 wt.% 4 wt.%		O Na Mg P Ca kV Tak	Ka Ka Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21 310 36 520 78 20 0 gle 35 0°	0.856 0.485 0.347 0.220 2.170 2.811	15378 wt 0.893 wt 0.251 wt 17.974 wt 37.521 wt	y. y. y. y. y.							
O Na P Ca kV Tab	Ka Ka Ka Ka	5.00 3.35 259.07 490.79 20.0 le 35.0	0.556 5 0.453 7 4.006 9 5.514	3 11.90: 5 8.89 5 0.60 5 23.28: 4 55.32	1 wt.% 1 wt.% 2 wt.% 4 wt.%		O Na Mg P Ca kV Tak	Ka Ka Ka Ka Ka	48 27 15 48 7 94 3 21 310 36 520 78	0.856 0.485 0.347 0.220 2.170 2.811	15378 wt 0.893 wt 0.251 wt 17.974 wt 37.521 wt	y. y. y. y. y.							

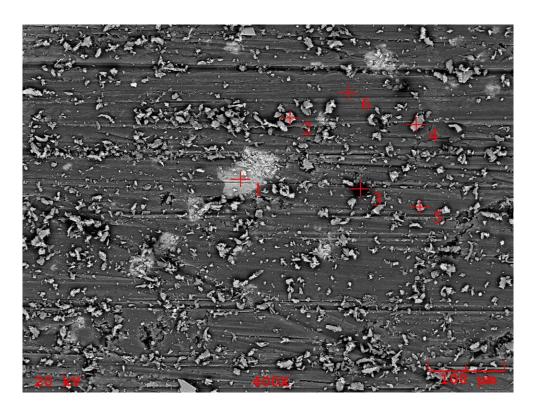


Figura 6.48 - Imagem da borda da amostra V38 (polida) ampliada 400 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 obtida através do MEV com o sinal BSD.

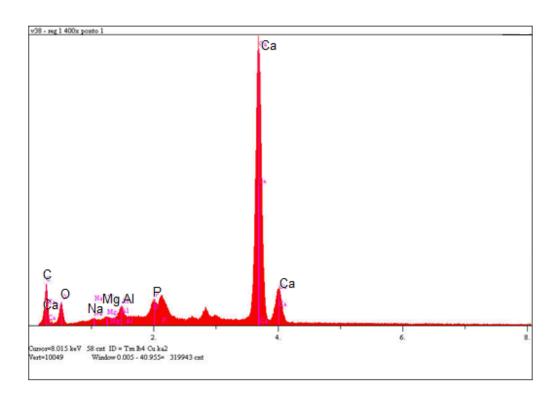


Figura 6.49 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.48.

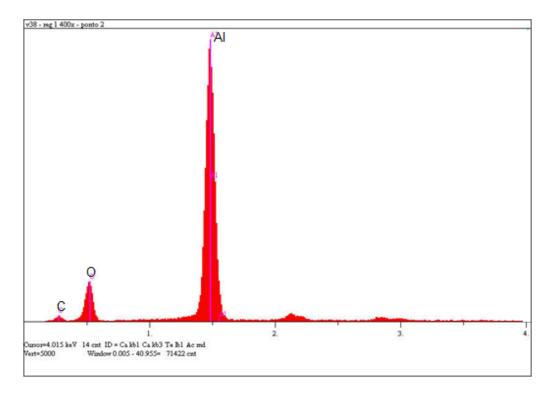


Figura 6.50 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.48.

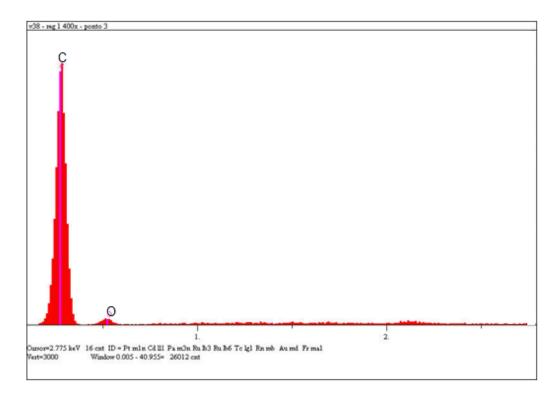


Figura 6.51 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 3 mostrado na Figura 6.48.

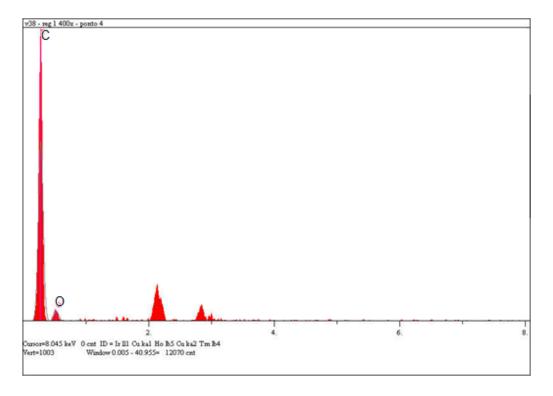


Figura 6.52 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 4 mostrado na Figura 6.48.

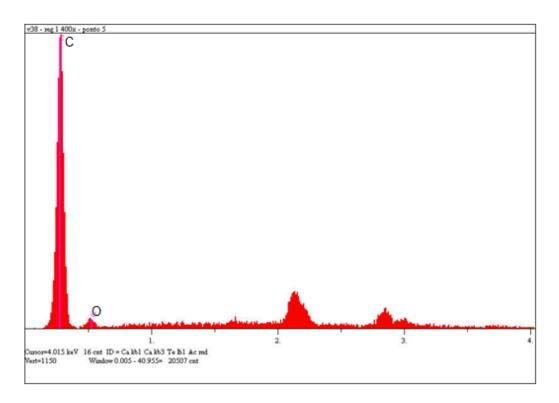


Figura 6.53 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 5 mostrado na Figura 6.48.

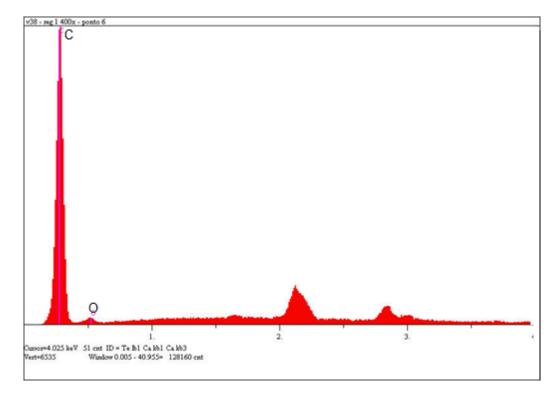


Figura 6.54 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 6 mostrado na Figura 6.48.

Tabela 6.9 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V38 (região da borda) referente aos pontos 1, 2, 3, 4, 5 e da Figura 6.48.

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Inten (c/		Error 2-sig	Conc		
C	Ka	53.33	1.119	48.400	wt.%		C	Ka	15.19	1.434	11.866	net %		C	Ka	37	131	6.457	83 200	wt.%	
0	Ka	32.21	0.869	42.467	wt.%		ŏ	Ka	158.11	4.627	34.012			0	Ka	1	1.14	1.118	16.800	wt.%	
Na	Ka	3.54	0.288	1076	wt.%		Al	Ka	1377.99	13.661									100,000	wt.%	Total
Mg	Ka	3.89	0302	0.817			M	La	15//99	15,001	100,000		Total								
P	Ka	4634	1.043	7.240							100,000	WL./«	10041	kV		82	20.0				
				100,000		Total	kV		20.0						off Ang	de 3	35.0°				
				ATTENDED TO	837175334 80	335000	100000	off Angl	55054733							retime 3					
kV		20.0							time 29.5												
Take	off Angle	35.0°					Емф	ed Phe	:CILLE 293												
		time 170.4																			
	(a) Pon	to 1					(b)	Ponto 2						(c)	Pont	to 3				
Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			E	t. Lir		ensity (c/s)	Error 2-sig			
			_											С	Ka		355.81	3.76	0 9600	7 wt.3	2:
C	Ka	210.64	5.472				С	Ka	253.22		80.059			ŏ			7.88			3 wt.	
0	Ka	10.97	1249	22.879	wt.%		0	Ka	10.21	1.267	19 941			300	120		7.00	0.50			& Total
				100,000	wt.%	Total					100,000	WL%	Total						100.00	00 WL.	* 100ai
														k	,		20.0				
kV		20.0					kV	30 <u>2</u> 7,00	20.0						keoff A	norle.	35.0°				
Take	off Ang	e 35.0°						eoff Ang								ingue Livetimo					
Elap	sed Liv	etime 28.1					Elaj	sed Lit	retime 25.4					F	afte err	-merim	6 100 2	5			
		d) Por	ito 4				(€	e) Po	onto 5						(f)	Pont	o 6				

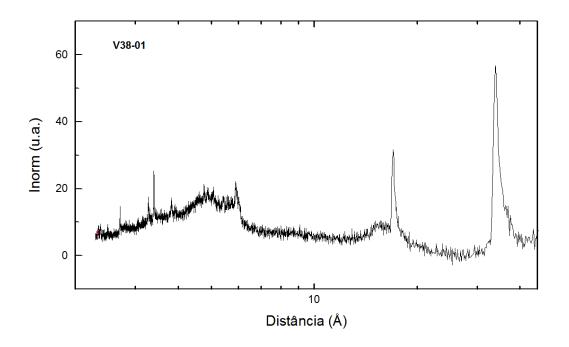


Figura 6.55 - Padrão de difração obtido para a amostra V38-01 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.

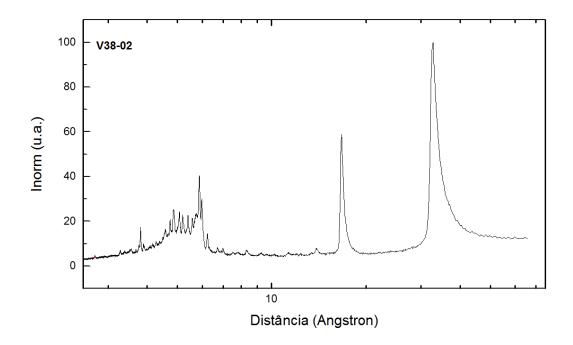


Figura 6.56 - Padrão de difração obtido para a amostra V38-02 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.

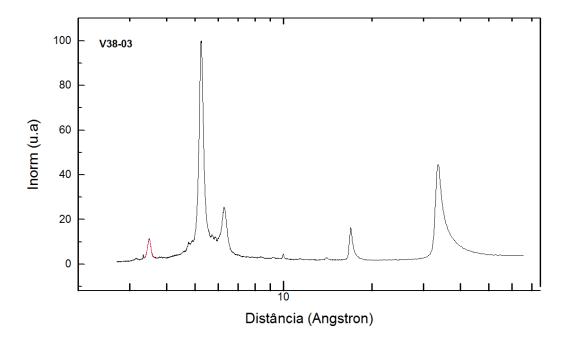


Figura 6.57 - Padrão de difração obtido para a amostra V38-03 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.

Amostra V43



Figura 6.58 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V43.

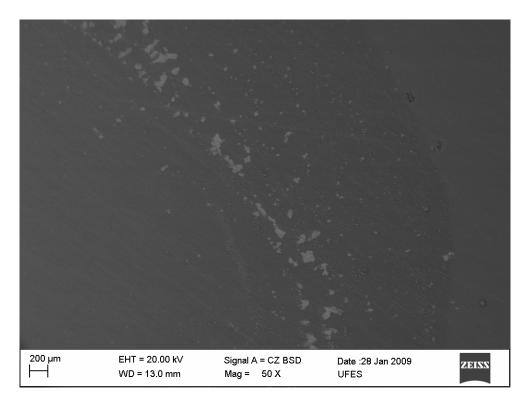


Figura 6.59 - Imagem da borda da amostra V43 (polida) aumentada 50 vezes obtida através de MEV utilizando o sinal BSD.

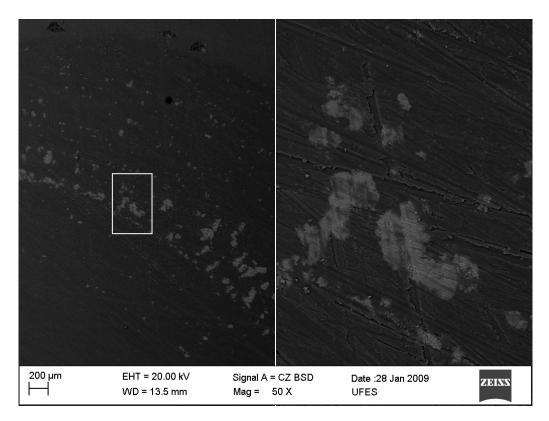


Figura 6.60 - Imagem dual obtida da amostra V43 (polida) aumentada 50 vezes obtida através de MEV utilizando o sinal BSD.

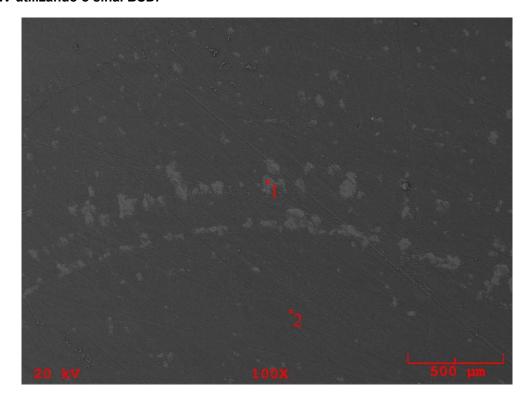


Figura 6.61 - Imagem da borda da amostra V43 (polida) ampliada 100 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV com o sinal BSD.

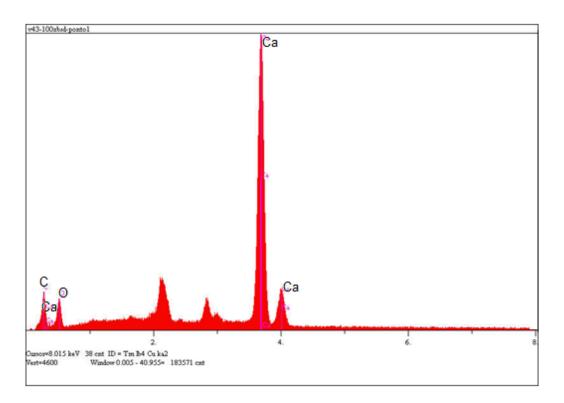


Figura 6.62 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.61.

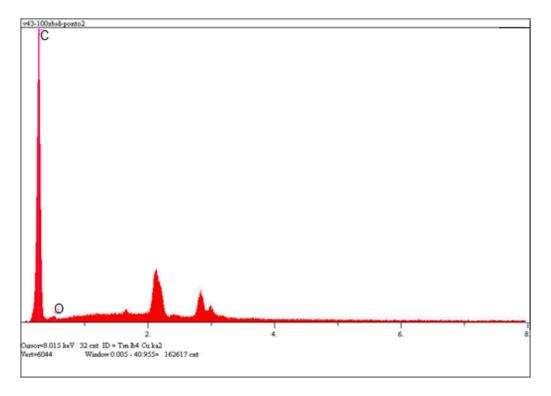


Figura 6.63 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.61.

Tabela 6.10 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V43 (região da borda) referente aos pontos 1 e 2 da Figura 6.61.

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc		
C	Ka	39.67	1260	12,426	wt.%		С	Ka	341.89	3.698	89.690	wt.%	
0	Ka	32.15	1.134	38.782	wt.%		0	Ka	4.89	0.442	10310	wt.%	
Ca	Ka	527.59	4.594	48.792	wt.%		80.758	1,035-50	500,0000	52630	100,000	wt.%	Total
				100,000	wt.%	Total							
							kV		20.0				
kV		20.0						off Ang					
Take	off Angl	e 35.0°						_	etime 100.0				
Elap	sed Live	time 100.0											
	(a) Ponto	o 1					(b) ponto	2			

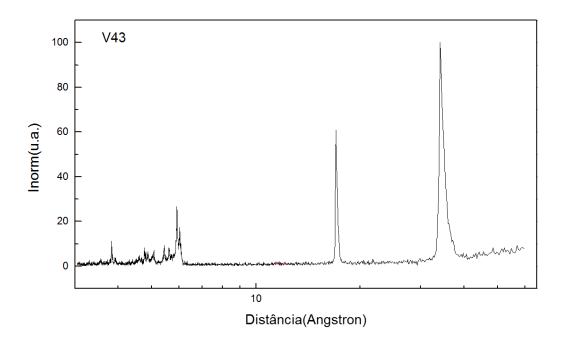


Figura 6.64 - Padrão de difração obtido para a amostra V43 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.

Amostra V54



Figura 6.65 - Fotografia óptica do grupo de amostras catalogadas como V54.

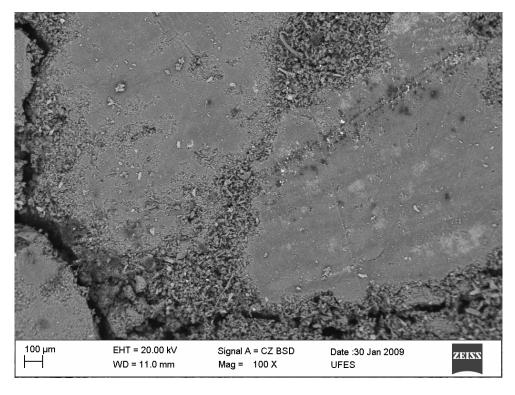


Figura 6.66 - Imagem da amostra V54 (polida) aumentada 100 vezes obtida através de MEV utilizando o sinal BSD.

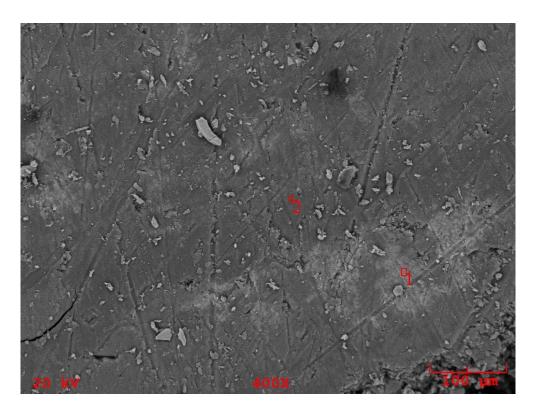


Figura 6.67 - Imagem da amostra V54 (polida) ampliada 400 vezes mostrando um contraste de composição nos pontos 1 e 2 obtida através do MEV com o sinal BSD.

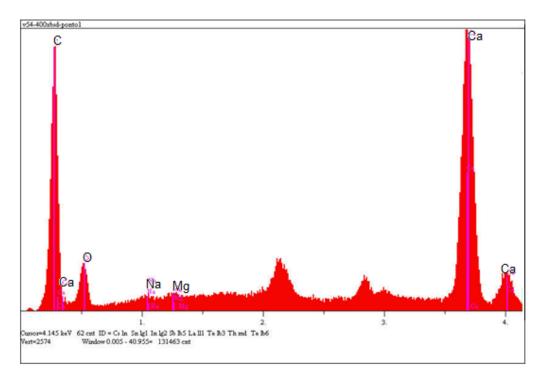


Figura 6.68 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 1 mostrado na Figura 6.67.

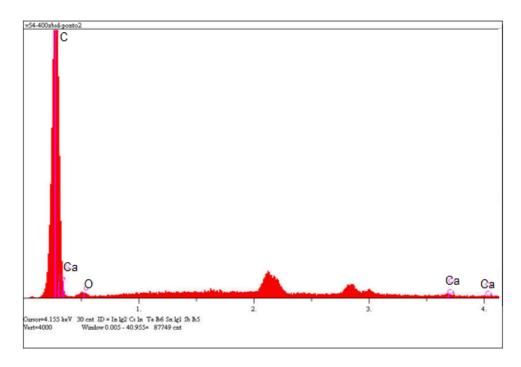


Figura 6.69 - Espectro obtido por EDS da composição do ponto 2 mostrado na Figura 6.67.

Tabela 6.11 - Quantificação dos elementos encontrados na amostra V54 referente aos pontos 1 e 2 da Figura 6.67.

Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			Elt.	Line	Intensity (c/s)	Error 2-sig	Conc			
C	Ka	153.12	2.475	40.317	wt.%		С	Ka	312.60	3.536	88.829	wt.%		
0	Ka	29.66	1.089	32 225	wt.%		0	Ka	4.74	0.436	10.682	wt.%		
Na	Ka	3.86	0.393	0.626	wt.%		Ca	Ka	3.13	0.354	0.489	wt.%		
Mg	Ka	3.75	0.387	0.413	wt.%						100,000	wt.%	Total	
Ca	Ka	291.86	3.417	26.418	wt.%									
				100,000	wt.%	Total	kV		20.0					
							Take	off Ang	le 35.0°					
kV		20.0					Elap	sed Liv	etime 100.0					
Take	off Angl	le 35.0°					2000							
Еlф	sed Liv	etime 100.0												
	(a)	Ponto	1					(b)	Ponto 2					

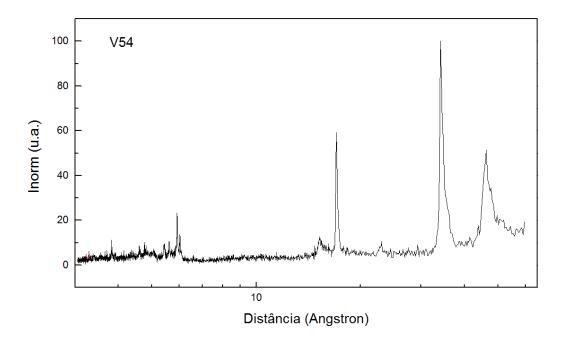


Figura 6.70 - Padrão de difração obtido para a amostra V54 utilizando a técnica de difração de raios X por pó.

Os picos que não aparecem identificados nos espectros de EDS se referem ao ouro devido ao processo de metalização das amostras.

Pode-se notar que a microscopia eletrônica de varredura das amostras ovais e irregulares mostrou que as amostras analisadas possuem regiões de diferentes contrastes espalhadas pela amostra ao contrário das geométricas que possuem anéis concêntricos ao redor do centro da amostra.

Após a identificação dos elementos químicos por EDS, voltou-se à base de dados e uma nova procura pelas fichas PDF que mais se aproximavam do padrão de difração obtido para as amostras V16, V40, V41, V45, V38, V43 e V54 foi feita. As fichas PDF que mais se aproximaram do padrão foram:

- 07-0742 colesterol (C₂₇H₄₆ O);
- 08-0702 acetato de ergosterol ($C_{30}H_{46}O_2$);
- 51-2129 1,3-Bis(4-fenoxibezil) benzeno ($C_{32}H_{22}O_4$);
- 40-1886 bilirrubinato de cálcio (C₃₃H₄₆Ca_xN₄O₆);
- 13 0689 bilirrubina ($C_{33}H_{46}N_4O_6$);

- 21 0839 fosfato de cálcio (CaP₄O₁₁);
- 03 1067 carbonato de cálcio (γ-CaCO₃) (aragonita);
- 05 0012 palmitato de cálcio (C₃₃H₆₂CaO₄).

Com essas fichas identificou-se os compostos presentes nas amostras e calculou-se a porcentagem de fase presente em cada uma delas. Lembra-se que o método utilizado para calcular a porcentagem de fase possui um erro de 5% no valor calculado. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6.12.

Tabela 6.12 - Porcentagem de fase e elementos químicos encontrados nas amostras.

Amostra	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	EDS
	C ₂₇ H ₄₆ O	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	C ₃₂ H ₂₂ O ₄	C ₃₃ H ₄₆ Ca _x N ₄ O ₆	C ₃₃ H ₄₆ N ₄ O ₆	CaP ₄ O ₁₁	γ- CaCO₃	C ₃₃ H ₆₂ CaO ₄	
V16	57	41	2	-	-	-	-	-	C, O
V38-01	61	39	-	-	-	-	>1	-	C, O, Na,Mg
V38-02	57	42	-	-	-	1	-	-	P,Ca, Cu, Al
V38-03	64	36	-	>1	-	-	-	-	CI,K
									C, O, Na,Mg
V40	58	42	-	-	-	-	-	-	K,Ca, Al,Cl
									Si
V41-01	58	41	-	>1	>1	-	-	-	C, O, Na,Mg
V41-02	58	42	-	-	-	-	-	-	K,Ca, Al, Cl
V43	57	43	-	-	-	-	>1	-	C, O, Ca
V45-01	57	42	-	-	-	1	-	-	C, O, Ca, P
V45-02	53	47	-	-	-	>1	-	-	,
V54	29	21	-	-	-	-	-	50	C, O, Na,Mg
									Ca

Nota-se que as fases encontradas para as amostras V38, V40, V41 e V54 não possuem em sua composição todos os elementos químicos encontrados através das medidas de EDS.

Observa-se através da Figura 6.71 que a maioria dos doadores é do sexo feminino.

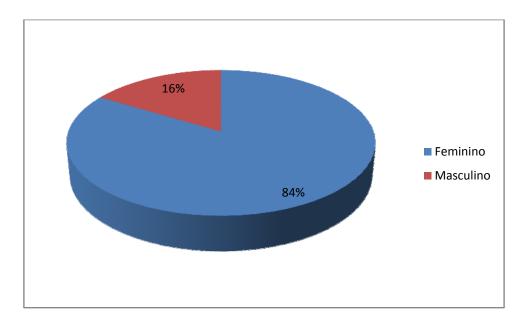


Figura 6.71 - Sexo dos doadores.

<u>Capítulo 7</u>

7. Conclusões

Este é o primeiro estudo cristalográfico efetuado em pedras de vesícula realizado no Estado do Espírito Santo. Neste estudo pioneiro conseguiu-se propor uma classificação para as pedras de doadores residentes no Espírito Santo em três grupos morfologicamente distintos a seguir rotulados: oval, geométrica e irregular. A forma oval foi encontrada com maior incidência dentro do lote amostral obtido.

A análise preliminar apontou que o colesterol é a fase majoritária presente nas amostras e o refinamento dos parâmetros de rede dos cristais de colesterol presente nas amostras mostrou que tais parâmetros estão próximos dos valores encontrados na ficha PDF catalogada, não havendo variações da estrutura desses cristais nas diferentes amostras.

O estudo das amostras V16, V38, V40, V41, V43, V45 e V54 através do MEV foi essencial para se determinar os átomos presentes nas amostras e assim determinar quais são os compostos presentes nas amostras através da técnica de difração de raios X por pó.

Conseguiu-se determinar todos os compostos presentes nas amostras V16, V43 e V45, e a porcentagem de fase de cada uma delas. Nas amostras V38, V40, V41 e V54 não encontrou-se compostos que possuíam todos os átomos encontrados por EDS, talvez pelo fato de que o intervalo do ângulo de varredura nas medidas de difração de raios X por pó deveria ter sido mais extenso. Ou esses átomos podem ter formado compostos nanocristalinos que em pequena quantidade não seriam detectados através da técnica de difração de raios X por pó.

Os anéis concêntricos ao redor do centro das amostras V38 e V43, classificadas como geométricas podem estar associados a um tipo específico de formação e crescimento dos cristais nesse tipo de formato.

Verificou-se neste estudo que, a prevalência da litíase é maior em pessoas do sexo feminino.

Sugestões para Trabalhos **Futuros**

Há muito o que ser estudado sobre as pedras de vesícula coletadas no Estado do Espírito Santo. A seguir estão algumas sugestões para a continuação deste trabalho:

- Refazer as medidas de difração de raios X por pó com um intervalo do ângulo de varredura maior. Sugere-se: θ_{min} = 2° a $\theta_{máx}$ = 120°.
- Além das medidas de MEV com as amostras polidas, realizar medidas com as amostras fraturadas para estudar sua topografia e verificar possíveis tipos de formação para amostras ovais, geométricas e irregulares.
- Tentar parceria com hospitais a fim de coletar mais amostras e obter os dados do doador para possíveis correlações futuras, como por exemplo: associar a classificação das amostras ou compostos encontrados nas amostras com o tipo de dieta do doador, tipo sanguíneo ou idade do doador.

Glossário

1,3 – Bis(4-fenoxibenzil) benzeno – $(C_{32}H_{22}O_4)$.

Acetato de Ergosterol – $(C_{30}H_{46}O_2)$.

Ácido quenodesoxicólico - Ácido biliar, geralmente conjugada com glicina ou taurina. Age como detergente para solubilizar as gorduras para a absorção intestinal e é reabsorvido pelo intestino delgado.

Ácidos biliares glico e tauroconjugados - Os ácidos biliares primários são derivados do colesterol no fígado e geralmente conjugados com glicina ou taurina. Os ácidos biliares secundários são mais tarde modificados por bactérias no intestino. Desempenham um papel importante na digestão e absorção de gordura. Também têm sido usados farmacologicamente, especialmente no tratamento de pedras biliares.

Afecção – Doença encarada sob seu aspecto atual, independentemente do diagnóstico de sua causa: afecção nervosa.

Anemia hemolítica - Anemia devido à diminuição do tempo de vida dos eritrócitos.

Árvore biliar - é o termo anatômico dado a via pela qual a bile é secretada pelo fígado para o duodeno, da maioria dos mamíferos. Este é referido como árvore porque inicia com muitos ductos pequenos que terminam no ducto biliar comum.

Ascaris lumbricoides - Espécie de nematóide parasita mais comumente encontrado no intestino humano. Apresenta distribuição mundial, embora tenha maior prevalência em áreas de saneamento deficiente. Infestação humana com A. lumbricoides é adquirida pela ingestão de ovos embrionados inteiros presentes em solo contaminado.

Assintomáticos – Que se apresenta sem os sintomas característicos.

Bilirrubina – (C₃₃H₄₆N₄O₆) pigmento amarelo que é produto da degradação da hemoglobina. Quando aumenta no sangue, acima de seus valores normais, pode produzir uma coloração amarelada da pele e mucosas, denominada icterícia. Pode estar aumentado no sangue devido a aumento da produção do mesmo (excesso de degradação de hemoglobina) ou por dificuldade de escoamento normal (p. ex. cálculos biliares, hepatite).

Bilirrubinato de Cálcio – $(C_{33}H_{46}Ca_xN_4O_6)$.

Bragg - foi um físico e químico do Reino Unido, que em 1915 recebeu o prêmio nobel da física pelos trabalhos na análise da estrutura cristalina através da difração de raios X.

Cálculos biliares - são depósitos de cristais que se formam na vesícula biliar ou nos canais biliares (vias biliares).

Carbonato de cálcio - (y-CaCO₃) é um sólido branco, que é pouco solúvel na água. O carbonato de cálcio decompõe-se por aquecimento formando-se óxido de cálcio (cal viva) e dióxido de carbono. Ocorre na natureza como os minerais calcita e aragonita.

Colangite – inflamação de um ducto biliar.

Colecistectomia - é a retirada cirúrgica da vesícula biliar.

Colecistite - Inflamação da vesícula biliar.

Colecistocinina- é um hormônio gastro-intestinal.

Colédoco - pequeno canal que é a principal via de eliminação biliar, formado pelo canal cístico e pelo canal hepático, desembocando no intestino.

Colelitíase ou litíase biliar - é uma doença causada pela formação de cristais de componentes biliares ou de substâncias anormais na bile.

Colesterol – (C₂₇H₄₆O) é um esteroide lipídico encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais.

Empiema - Presença de pus numa cavidade do corpo ou de um órgão.

Ergosterol – é um esterol precursor da vitamina D.

Escherichia coli - é uma bactéria bacilar Gram-negativa, que, juntamente com o Staphylococcus aureus é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiontes do Homem.

Esterificação é uma reação química reversível na qual um ácido carboxílico reage com um álcool produzindo éster e água.

Fosfato de cálcio – (CaP₄O₁₁) é um pó branco insolúvel. Encontra-se na natureza no mineral apatita e também em rochas fosfato. É também o principal constituinte dos ossos dos animais. O fosfato de cálcio pode também ser preparado pela mistura de soluções contendo íons de cálcio na presença de uma base. É usado extensivamente como fertilizante. O composto foi primeiramente chamado de ortofosfato de cálcio.

Gangrena - Necrose dos tecidos, devido á falta de irrigação sanguínea.

Hepatócitos - são células encontradas no fígado capazes de sintetizar proteínas, usadas tanto para exportação como para sua própria manutenção, por isso torna-se uma das células mais versáteis do organismo.

Hidroinsolúveis - substâncias não solúveis em água.

Icterícia - Coloração amarelada que adquire a pele e mucosas, devido ao aumento nas taxas sangüíneas de bilirrubina.

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, informações em www.ipen.br.

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, informações em <u>www.lnls.br</u>.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

Monoidrato de colesterol – é um cristal de colesterol contendo uma molécula de água para cada molécula de colesterol.

Necropsia - é um procedimento médico que consiste em examinar um cadáver para determinar a causa e modo de morte e avaliar qualquer doença ou ferimento que possa estar presente.

Palmitato de cálcio – (C₃₃H₆₂CaO₄).

Pancreatite - Inflamação aguda ou crônica do pâncreas.

Pelve - Parte mais baixa do abdome localizada entre os ossos do quadril. Os órgãos femininos da pelve incluem o útero, a vagina, os ovários, as trompas de falópio, bexiga e reto.

Prevalência – Número de casos clínicos ou de portadores existentes em um determinado momento, em uma comunidade, dando uma idéia estática da ocorrência do fenômeno. Pode ser expressa em números absolutos ou em coeficientes.

Raios X – são emissões eletromagnéticas de natureza semelhante a da luz visível.

Secretina - Hormônio secretado pela mucosa duodenal no momento da digestão e que desencadeia a secreção do suco pancreático e da bile.

Trato biliar - Vesícula biliar e seus ductos.

Trematóide hepático Opisthrorchis sinensis – são vermes planos em forma de folha encontrados na China, Japão e outros países daquela região.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

<u>Baixar</u>	livros	de	Adm	<u>iinis</u>	tra	ção

Baixar livros de Agronomia

Baixar livros de Arquitetura

Baixar livros de Artes

Baixar livros de Astronomia

Baixar livros de Biologia Geral

Baixar livros de Ciência da Computação

Baixar livros de Ciência da Informação

Baixar livros de Ciência Política

Baixar livros de Ciências da Saúde

Baixar livros de Comunicação

Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE

Baixar livros de Defesa civil

Baixar livros de Direito

Baixar livros de Direitos humanos

Baixar livros de Economia

Baixar livros de Economia Doméstica

Baixar livros de Educação

Baixar livros de Educação - Trânsito

Baixar livros de Educação Física

Baixar livros de Engenharia Aeroespacial

Baixar livros de Farmácia

Baixar livros de Filosofia

Baixar livros de Física

Baixar livros de Geociências

Baixar livros de Geografia

Baixar livros de História

Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura

Baixar livros de Literatura de Cordel

Baixar livros de Literatura Infantil

Baixar livros de Matemática

Baixar livros de Medicina

Baixar livros de Medicina Veterinária

Baixar livros de Meio Ambiente

Baixar livros de Meteorologia

Baixar Monografias e TCC

Baixar livros Multidisciplinar

Baixar livros de Música

Baixar livros de Psicologia

Baixar livros de Química

Baixar livros de Saúde Coletiva

Baixar livros de Serviço Social

Baixar livros de Sociologia

Baixar livros de Teologia

Baixar livros de Trabalho

Baixar livros de Turismo