

CRISTALOGÊNESE DO CLORETO DE COBRE: EFEITO DE EXTRATOS DE SEMENTES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)*

IBRAHIM OCTAVIO ABRAHÃO**

RESUMO

Estudam-se os modelos de cristalização de cloreto de cobre obtidos na presença de extratos de sementes de feijoeiro (*P. vulgaris* L.). São descritos e comparados os modelos obtidos em 11 séries de cristalização, com 5 repetições. Os fatores de variação envolvidos são: 3 variedades (roxinho, pintado, preto), 2 procedências (solos e solução nutritiva), 2 processos de obtenção de extrato (sementes secas e sementes úmidas) e 3 concentrações (0,05:0,5; 0,025:0,5 e 0,025:0,75). A conclusão principal é que o cloreto de cobre produz modelos de cristalização característicos e específicos para extratos de sementes de feijoeiro. Menos específicos são os efeitos de variedade e procedência, embora alguns caracteres possam ser assinalados.

INTRODUÇÃO

A aplicação do método de Pfeiffer a plantas envolve uma série de variáveis, cada uma das quais pode, isoladamente, afetar o modelo de cristalização. São fatores de variação: a espécie, a variedade, a idade da planta, o órgão, a procedência, a concentração de extrato e de cloreto de cobre, o método de obtenção do extrato, etc. A pesquisa com o método consiste, então, em fazer variar um fator enquanto os demais são mantidos constantes e estudar o seu efeito sobre o modelo de cristalização. Somente após essa fase é que se poderá cogitar da aplicação do método na solução de problemas específicos.

O presente trabalho trata da aplicação do método de Pfeiffer a sementes de feijoeiros, levando-se em conta as variáveis: variedade, concentração, procedência e tipo de extrato.

REVISÃO DA LITERATURA

PFEIFFER (1930) foi o primeiro a mostrar que a extrema variabilidade do hábito de cristalização do cloreto de cobre, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pode ser usada para caracterizar soluções. Estabelecido que o hábito é sensível e especificamente modificado por substâncias presentes na solução de que o cloreto se cristaliza por evaporação, numerosos trabalhos têm sido publicados sobre o assunto. A maior parte relata o êxito da aplicação do método na diagnose de várias moléstias. Os trabalhos com plantas são menos numerosos. O próprio PFEIFFER (1930) relata o efeito de adubação sobre o modelo de cristalização. Posteriormente (1940), observa diferenças significativas no modelo de cristalização obtido na presença de extratos de plantas sãs e atacadas por fungos.

* Entregue para publicação em 30/12/1975.

** Departamento de Solos e Geologia, ESALQ – USP.

MORRIS e MORRIS (1938) aplicaram o método a grãos de cereais (aveia, trigo e milho), amido e glicogênio. Obtiveram modelos característicos para cada tipo de semente, mas o amido obtido a partir de cada um dos cereais produz modelos equivalentes. Obtiveram, ainda, o que consideram a fração ativa dos extratos, responsável pelo modelo de cristalização. MORRIS e MORRIS (1939) comparam os modelos obtidos com glicogênio de origem animal e extrato de milho doce. Concluem que o extrato concentrado do milho doce produz modelo muito semelhante, mas não idêntico ao de glicogênio animal que, por sua vez produz modelo indistinguível do de glicogênio de milho doce. Ainda MORRIS e MORRIS (1941) procuram detectar a natureza de substâncias presentes com o glicogênio no extrato de milho doce e que afetassem o modelo de cristalização. Relatam que pequenas quantidades de proteínas podem afetar grandemente o modelo produzido pelo polissacarídeo, embora o efeito fosse não específico.

KRÜGER (1949), estudando extratos de *Hyoscyamus niger*, verificou que os modelos variam conforme o material seja colhido de manhã, à tarde ou à noite, concluindo que os de melhor qualidade são de plantas coletadas pela manhã. KRÜGER (1950) apresenta uma série de dados relativos a modelos de diferentes órgãos, de diferentes espécies, a maior parte das quais é de caráter medicinal. O autor procura correlacionar o modelo da planta com o do órgão para o qual é medicinal.

SELAWRY e SELAWRY (1957) publicam o mais completo trabalho até aqui sobre a cristalogênese do cloreto de cobre e sua aplicação a questões biológicas. Relatam os resultados obtidos com cerca de 21.000 séries de cristalização o que confere experiência suficiente para recomendarem técnica de cristalização muito bem estudada. A maior parte de seus resultados diz respeito ao estudo de substâncias puras, medicamentos, extratos de órgãos e, principalmente diagnose por cristalização. No capítulo dedicado a plantas os autores relatam a influência de diferentes órgãos de diferentes espécies medicinais sobre o modelo de cristalização. Relatam, ainda, a influência do tipo de solo e da natureza da adubação sobre o modelo de cristalização obtido com extratos de ervilhas.

ABRAHÃO (1965) aplica o método de Pfeiffer a extratos aquosos de diferentes órgãos (raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes) de três variedades de feijoeiro, em diferentes estágios de desenvolvimento. Conclui que a melhor relação de concentrações de extrato e de cloreto para ensaios comparativos é de 0,05:0,5. Conclui que os modelos variam especificamente em função da variedade, órgãos e idade da planta. ABRAHÃO (1970) aplica o método a sementes de café, com o objetivo principal de estabelecer as melhores concentrações a serem usadas com esse material. Recomenda o emprego da técnica de mistura filtrada e concentrações, por placa, entre 0,05 e 0,075 g, para extrato, e entre 0,5 g e 1,0 g, para cloreto. ABRAHÃO (1971) faz uma revisão crítica de todos os resultados alcançados até então na aplicação do método de Pfeiffer. ABRAHÃO (1971) apresenta um estudo morfológico sobre a cristalogênese do cloreto de cobre aplicada ao feijoeiro. Observa grande variação na morfologia dos modelos de cristalização e introduz alguns novos termos descritivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

- 1 – **Sementes.** Foram utilizadas sementes de 3 variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), obtidas de cultivo em vasos e em solução nutritiva: roxinho, pintado e preto.
- 2 – **Câmara de cristalização.** Utilizou-se a câmara recomendada por SELAWRY e SELAWRY (1957), e descrita por ABRAHÃO (1965) com dimensões 1,60 x 1,60 x 2,00 m, paredes duplas e adiabáticas, com dispositivo para manter a temperatura constante até 50°C. A câmara dispõe de mesa de vidro suspensa, de 0,70 x 1,50 x 0,01 m, rigorosamente nivelada, onde se processa a evaporação das soluções nas placas.
- 3 – **Placas de cristalização.** Foram utilizadas placas de vidro especialmente montadas para esse fim segundo recomendações de SELAWRY e SELAWRY (1957) e modificações de ABRAHÃO (1965).
- 4 – **Cloreto de cobre e material fotográfico.** Usou-se cloreto de cobre puríssimo p.a. Merck e filmes 35 mm Kodak Panatomic –X e papel Kodabromide F-4, que permitem grandes ampliações.

Métodos

- 1 – **Técnica de cristalização.** A técnica utilizada para ambiente de trabalho, velocidade de cristalização, controle de temperatura e umidade, nivelamento, limpeza das placas de cristalização, obtenção do extrato e decurso de cristalização é a que recomendam SELAWRY e SELAWRY (1957), com as modificações sugeridas por ABRAHÃO (1965).
- 2 – **Planejamento.** Foram efetuadas 11 séries de cristalização, com 5 repetições, em conjuntos de 4, 4 e 3 séries, num total de 55 placas. Os resultados obtidos nas séries 1 a 4 foram a base para as séries 5 a 8 e os obtidos nas séries 1 a 8 a base para 9 a 11. O esquema experimental adotado permitiu, então, estudar:
 - a) 2 métodos de obtenção de extrato: de sementes secas e de sementes deixadas previamente em água por 6 horas.
 - b) 3 concentrações diferentes de extrato: cloreto de cobre: 0,05:0,5; 0,025:0,5 e 0,025:0,75.
 - c) 2 procedências de sementes: de solos cultivados em vasos, e de solução nutritiva completa.
 - d) 3 variedades: roxinho, pintado e preto.

As 11 séries foram as seguintes:

| | | | |
|----------------|-------------------------------|-------------------|------------|
| Séries 1 a 4: | sementes secas | x solo | x 0,05:0,5 |
| | sementes úmidas | solução nutritiva | |
| Séries 5 a 8: | sementes de solo | x 0,025:0,5 | |
| | sementes de solução nutritiva | 0,025:0,75 | |
| Séries 9 a 11: | sementes roxinho | x 0,05:0,5 | |
| | sementes pintado | | |
| | sementes preto | | |

3 — **Exame, descrição e protocolo.** As placas foram protocoladas, descritas e fotografadas individualmente. A descrição se fez com base nos termos descritivos de SELAWRY e SELAWRY (1957) e ABRAHÃO (1965, 1971). Para cada espécie foi estabelecido um padrão médio das 5 repetições. De cada placa obteve-se uma fotografia em tamanho natural e pelo menos 5 com aumento de 3X, de regiões da placa de interesse particular. Eventualmente, utilizaram-se maiores aumentos nas comparações, com base no arquivo fotográfico das 290 fotografias obtidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seguem-se as descrições das 11 séries e algumas observações sobre cada conjunto de ensaios.

1 — **Séries 1 a 4.** Os extratos foram semelhantes, mais turvos e com mais resíduo para sementes úmidas, mais para sementes de solução nutritiva do que de solos.

Série 1: sementes de solo, secas, 0,05:0,5

Identidade perfeita. Cristalização bem diferenciada, sem nenhum indício de cristalização fibrosa. Centragem regular, coordenação e irradiação boas. Individualidade comprometida pela cobertura da cristalização central e pela abundância de deposições na periferia, sendo as agulhas de bom calibre. Formas vazias presentes, bem delimitadas, com muitas deposições. Borda bem diferenciada.

Série 2: sementes de solo, úmidas, 0,05:0,5

Identidade perfeita. Cristalização bem diferenciada, de tipo próprio, com região circular de cobertura total em torno do centro. Centragem perfeita. Coordenação e irradiação boas. Individualidade má na região do centro, melhorando com a irradiação, com agulhas de bom calibre. Cristalização fibrosa ausente. Grande quantidade de deposições. Formas vazias sempre presentes, bem delimitadas, com deposições. Borda bem diferenciada.

Série 3: sementes de solução nutritiva, secas, 0,05:0,5

Identidade perfeita. As mesmas observações gerais das séries anteriores são válidas aqui, sendo inferiores a coordenação e irradiação. Individualidade pior, tanto na região

de alta cobertura como na periferia, com menor calibre das agulhas. Muito maior quantidade de deposições entre as agulhas e no interior de vacúolos, sempre presentes e bem delimitados. As deposições prejudicam a nitidez do quadro e a diferenciação da borda.

Série 4: sementes de solução nutritiva, úmidas, 0,05:0,5

Identidade perfeita. Mesmas observações da série anterior com um excesso de deposições prejudicando o quadro. Novamente se observa o bom aspecto das agulhas e as formas vazias bem definidas. Borda comprometida pelas deposições.

As séries de 1 a 4 mostram com muita nitidez a influência específica do extrato de sementes sobre a cristalização do cloreto de cobre. O quadro geral tem caracteres muito bons, estando ausente cristalização fibrosa e as agulhas têm excelente calibre.

A grande quantidade de deposições foi uma constante nas 4 séries, exercendo influência negativa. Ocorrem por toda a placa, freqüentemente dendríticas, prejudicando a nitidez do quadro e a perfeição das formas vazias, estas de ocorrência sistemática.

Nenhuma vantagem foi observada através do preparo de extrato a partir de sementes deixadas na água. Pelo contrário, tal procedimento torna o extrato ainda mais turvo, acarretando maior quantidade de deposições, especialmente para sementes de solução nutritiva.

A concentração 0,05:0,5 é satisfatória no que diz respeito à obtenção de modelos típicos, de fácil reconhecimento. Caracteres diferenciais podem ser estabelecidos. Outras concentrações, todavia, deverão ser ensaiadas, visando à diminuição de deposições.

2 – **Séries 5 a 8.** Em vista dos resultados das séries anteriores, passa a ser usado apenas extrato de sementes secas, na concentração de 0,025 g por placa. Para cloreto incluiu-se também a concentração 0,75 g por placa, a fim de provocar uma definição ainda melhor nas formas vazias e na configuração geral.

Série 5: sementes de solo, 0,025:0,75

Boa identidade. Tipo de cristalização muito definido, com centragem perfeita e coordenação, irradiação boas. Individualidade satisfatória na periferia da cristalização central, agulhas de bom calibre. Formas vazias perfeitas, contendo deposições que também ocorrem entre as agulhas, em quantidade moderada. Borda bem diferenciada.

Série 6: sementes de solo, 0,025:0,75

Identidade perfeita com relação ao tipo de cristalização, com pequenas variações de centragem. Boa diferenciação geral, coordenação e irradiação satisfatórias e boa individualidade na periferia da cristalização central. Formas vazias perfeitas, algumas extremamente bem delimitadas (fig. 1), contendo ou não deposições (figs. 3, 4, 5). Borda bem diferenciada, com uma estreita faixa de agulhas curtas junto ao anel de vidro.

Série 7: sementes de solução nutritiva, 0,025:0,5

Boa identidade. Cristalização de bom tipo, bem definido, de centragem regular e coordenação e irradiação satisfatórias. Identidade regular na periferia da região central,

que é inteiramente coberta. Formas vazias bem delimitadas, pequenas, com deposições. Estas são generalizadas, abundantes, prejudicando a diferenciação da borda.

Série 8: sementes de solução nutritiva, 0,025:0,75

Identidade perfeita, especialmente para o tipo de cristalização. Centragem perfeita. Cristalização central inteiramente coberta de cristais. Coordenação e irradiação satisfatórias. Individualidade regular na periferia da região central. Deposições presentes, em quantidade menor que na série anterior. Formas vazias de delimitação perfeita, mas muito pequenas, sem deposições (fig. 2). Borda bem diferenciada, com faixa estreita de agulhas curtas junto ao anel de vidro.

Os modelos de cristalização ganharam maior clareza, especialmente os de 0,75 g. Para sementes de solução nutritiva, 0,025 g de extrato ainda é concentração alta. Para qualquer concentração, todavia, o modelo para sementes é sempre de muito bons caracteres e típico.

Caracteres diferenciais podem ser estabelecidos. Na concentração 0,025:0,75 verifica-se claramente que as formas vazias nas sementes de solos são maiores que as de solução nutritiva, onde são muito diminutas, apesar de bem delimitadas (figs. 1 e 2). O mesmo ocorre na concentração 0,025:0,5, com menor nitidez. Também a maior quantidade de deposições nos vacúolos de sementes de solução nutritiva é caráter possivelmente diferencial entre as procedências.

3 — **Séries 9 a 11:** Utilizou-se a concentração 0,05:0,5, recomendada para ensaios comparativos com feijoeiro (ABRAHÃO, 1965), introduzindo-se 3 variedades da planta como nova variável.

Série 9: sementes, variedade roxinho, 0,05:0,5

Identidade perfeita. A série mostra cristalização de tipo muito definido e constante, com variações mínimas entre as repetições. Centragem má ou regular, ocorrendo 3 ou 4 centros, extremamente nítidos, a cada um dos quais se filia uma parte bem definida da cristalização. A região central da placa, praticamente circular, destaca-se com muita nitidez, contrastando com a borda. É de cristalização espessa, com cobertura praticamente total da superfície. As agulhas, apesar de seu bom calibre, têm sua individualidade comprometida pela cobertura na cristalização central, melhorando sensivelmente na periferia dessa região, na transição com a borda. Deposições são abundantes em toda a placa, mais visíveis nas regiões de maior espaçamento das agulhas, na borda e no interior de formas vazias. Estas estão sistematicamente presentes junto aos centros de cristalização, sendo geralmente pequenas e de boa delimitação. Borda larga, de dimensões constantes em toda a circunferência, demonstrando transição gradativa com a região central. Constitui-se de agulhas longas, bem individualizadas e de bom calibre, formando leques no limite com a cristalização central. Inteira ausência de anéis concêntricos de qualquer tipo e de ondas. Junto ao anel de vidro uma estreita faixa mostra-se constituída de agulhas curtas.

Série 10: sementes, variedade pintado, 0,05:0,5 (fig. 6)

Identidade perfeita quanto ao aspecto geral do modelo, comprometida por variações de centragem, número de centros e tamanho de formas vazias. Centragem de regular a má, com 2 a 4 centros muito nítidos e caracterizados, geralmente bem afastados. Diferenciação geral, coordenação e irradiação boas. A cristalização central é de tipo muito definido, espessa, destacando-se bem na placa. Nessa região a individualidade não é boa, em virtude da cobertura praticamente total. Na transição com a borda, com o aumento de espaçamentos entre as agulhas, a individualidade é muito melhor. Deposições generalizadas e abundantes, bem visíveis na região de transição, na borda e no interior dos vacúolos. Estes sempre ocorrem, junto aos centros, de tamanho variável, muito bem delimitados. Borda bem diferenciada, de largura constante, constituída de agulhas longas, com leques na transição da cristalização central. É de cristalização fina, agulhas longas, bem individualizadas, com tendência a dar anéis concêntricos. Uma descontinuidade é observada entre a borda e uma estreita faixa periférica, de agulhas curtas, junto ao anel de vidro.

Série 11: sementes, variedade preto, 0,05:0,5

Identidade perfeita, principalmente entre 4 repetições, com desvio na última apenas para número de centros. Centragem perfeita, com apenas um centro de cristalização, muito nítido, coincidindo ou não com o centro geométrico da placa, do qual as agulhas irradiam para constituir toda a cristalização. Diferenciação geral, coordenação e irradiação muito boas. Região central de cobertura grande, de tipo definido, praticamente circular em torno do centro. Nessa região a individualidade das agulhas não é boa, apesar da sua tendência para bom calibre. Essa região é de diâmetro relativamente pequeno. Sua transição com a borda propriamente dita é uma faixa intermediária larga, onde as agulhas são muito espaçadas, de bom calibre e muito boa individualidade. Deposições generalizadas, mais visíveis na faixa de transição, na borda e no interior de vacúolos. Estes ocorrem sempre bem delimitados. Borda bem diferenciada, de largura constante, constituída de agulhas longas, ramificadas em leques no limite com a faixa de transição. Inteira ausência de anéis concêntricos, de ondas e de cristalizações transversais.

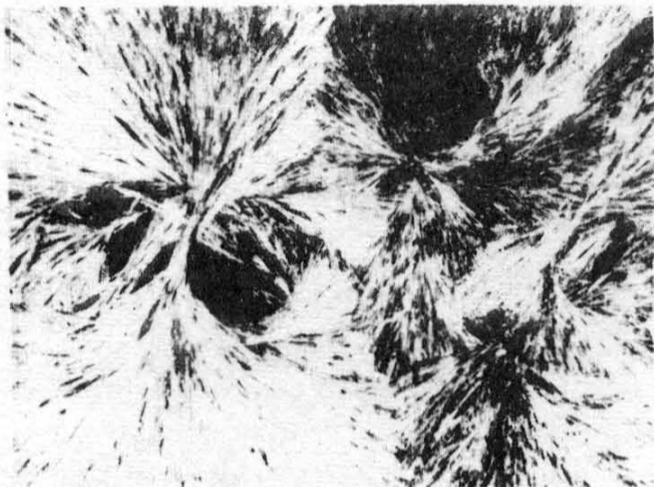


Figura 1 - Série 6: sementes de solo, 0,025:0,75, formas vazias.

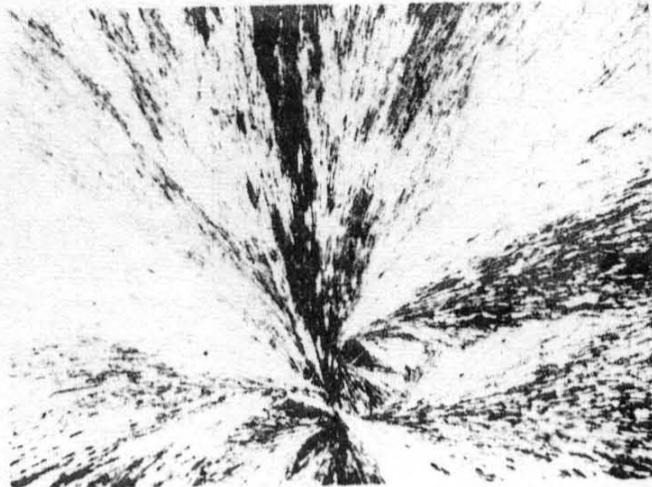


Figura 2 - Série 8: sementes de solução nutritiva, 0,025:0,75, formas vazias, 3X.

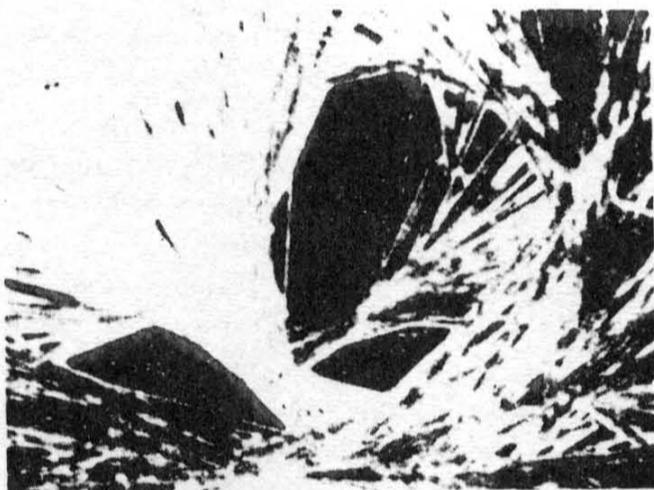


Figura 3 - Série 6: sementes de solo, 0,025:0,75, formas vazias sem deposições, 20X.

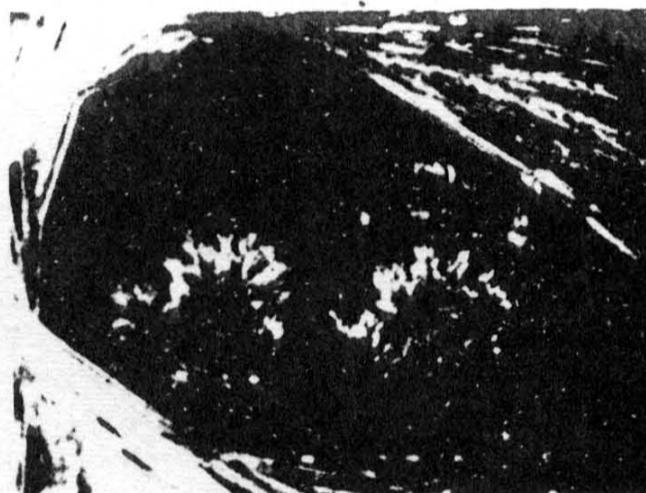


Figura 4 - Série 6: sementes de solo, 0,025:0,75, formas vazias com deposições diferenciadas, 20X.

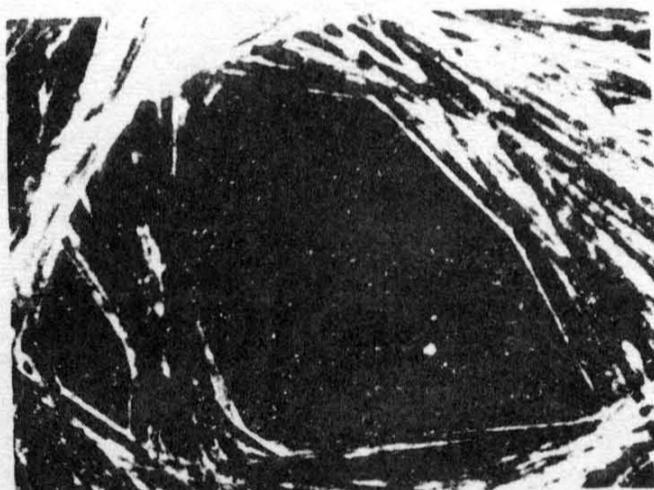


Figura 5 - Série 6: sementes de solo, 0,025:0,75, formas vazias com deposições não diferenciadas, 20X.

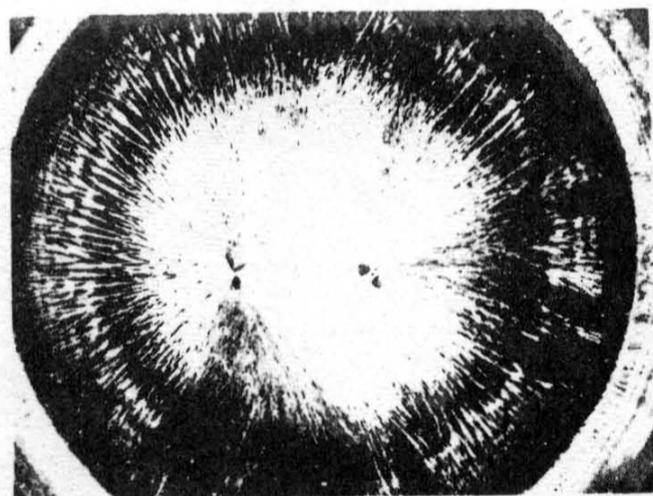


Figura 6 - Série 10: sementes de solução nutritiva, 0,05:0,05, variedade roxinho, cristalização central e borda, 1X.

CONCLUSÕES

- 1 – Nenhuma vantagem foi assinalada na obtenção de extrato através de sementes úmidas. Pelo contrário, seus extratos são mais turvos e a suspensão acaba por se traduzir em tal quantidade de deposições que prejudica o modelo de cristalização.
- 2 – Nas concentrações estudadas, deve-se recomendar 0,05:0,5, uma vez que é a mais indicada para ensaios comparativos com outros órgãos e produz modelo característico. Nada impede, porém, o emprego da concentração 0,025:0,75, pois os modelos melhoram e as deposições diminuem, especialmente para sementes de solução nutritiva.
- 3 – O modelo para sementes é característico, não se confundindo com o de nenhum outro órgão. Os caracteres mais evidentes e que permitem seu pronto reconhecimento são o tipo da cristalização central, a diferenciação e largura da borda, o calibre das agulhas, a faixa de transição entre a região central e a borda, a inteira ausência de anéis concêntricos e ondas. As séries de sementes assumem, então, um caráter típico e sem indícios de caracteres perturbadores, como cristalização fibrosa e espessamentos. Apenas a espessura da cristalização central e a quantidade de deposições seriam desejáveis diminuir.
- 4 – Caracteres diferenciais entre variedades não são numerosos e seguros. O mais evidente é a perfeita centragem que diferencia a variedade preto das demais. Essa variedade apresenta, também, uma região de transição entre a borda e a cristalização central mais larga que as outras e com perfeita individualidade das agulhas, decorrente de seu maior espaçamento. Tendência para formação de anéis concêntricos só se observa para pintado e cristalizações transversais só foram constatadas para roxinho, embora sem constância. Apenas para roxinho as agulhas da borda atingem sistematicamente a periferia, sem deixar uma pequena faixa de descontinuidade, observada para preto e pintado. As formas vazias apresentam variações entre uma série e outra em tamanho e número, mas variações dentro da série impedem que se forneçam indicações mais precisas.
- 5 – A área das formas vazias parece ser uma clara tendência de distinção entre procedências diferentes de sementes de feijoeiro sendo maiores nas de solos do que nas de solução nutritiva. A quantidade de deposições, todavia, é maior para sementes de solução nutritiva. Tratando-se de caracteres quantitativos, um estudo mais específico sobre o assunto é recomendado.

SUMMARY**EFFECT OF BEAN SEED (*Phaseolus vulgaris* L.) EXTRACT ON THE CRYSTALLOGENESIS OF COPPER CHLORIDE**

Crystallization models of copper chloride obtained in the presence of bean seed extracts (*P. vulgaris* L.) are studied. The models obtained in 11 crystallization series, replicated 5 times, are described and compared. The sources of variation considered are as follows: 3 bean varieties (roxinho, pintado, preto), 2 origins (soils and nutrient solution), 2 extracting procedures (dry seeds and humid seeds) and 3 concentrations (0,05:0,5; 0,025:0,5 and 0,025:0,75). The main conclusion is that copper chloride yields crystallization models that are specific and characteristic for bean seeds extract. The effects of variety and origin though less pronounced contribute to the appearance of some characters.

LITERATURA CITADA

- ABRAHÃO, I.O., 1965. Cristalogênese do cloreto de cobre. Aplicação do método de Pfeiffer ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese de doutoramento apresentado à ESALQ, 134 pp.
- ABRAHÃO, I.O., 1970. Aplicação do método de Pfeiffer a sementes de café (*Coffea arabica* L.). Anais da ESALQ, Piracicaba, XXVII: 61-71.
- ABRAHÃO, I.O., 1971. Cristalogênese do cloreto de cobre aplicada a problemas biológicos. Revista da Agricultura, XLVI, (2-3): 121-128.
- ABRAHÃO, I.O., 1971. Morfologia do cloreto de cobre na presença de extratos aquosos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Anais da ESALQ, Piracicaba, XXVIII: 199-216
- KRÜGER, H., 1949. Tagezeiten - Rhythmen bei Pflanzen. Weleda-Nachrichten 22: 8-11.
- KRÜGER, H., 1950. Kupferchlorid-Kristallisationem, ein Reagens auf Gestaltungskräfte des Lebendigen. Weleda-Schriftenreihe. Heft, 5-30.
- MORRIS, D.L. e MORRIS, C.T., 1938. Specific effects of certain tissue extracts on the crystallization pattern of cupric chloride. Journal of Physical Chemistry, 43: 623-629.
- MORRIS, D.L. e MORRIS, C.T., 1939. Glycogen in the seed of *Zea mays* (variety golden bantam). Journal of Biological Chemistry. Baltimore, USA, 130: 535-544.
- MORRIS, D.L. e MORRIS, C.T., 1941. The modification of cupric chloride crystallization patterns by traces of proteins. Journal of Biological Chemistry. Baltimore, USA, 141: 515-521.
- PFEIFFER, E., 1930. Kristalle. Orient-Occident - Verlag Stuttgart, Alemanha, 81 pp.
- PFEIFFER, E., 1940. Sensitive Crystallization. Chemical Products and the chemical news. Londres, nº 3: 21-25.
- SELAWRY, A. e SELAWRY, O., 1957. Die Kupferchloridekristallisation in Naturwissenschaft und Medicin. Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, Alemanha, 232 pp.