

CRISTALOGÊNESE DO CLORETO DE COBRE APLICADA A PROBLEMAS BIOLÓGICOS

IBRAHIM OCTAVIO ABRAHÃO

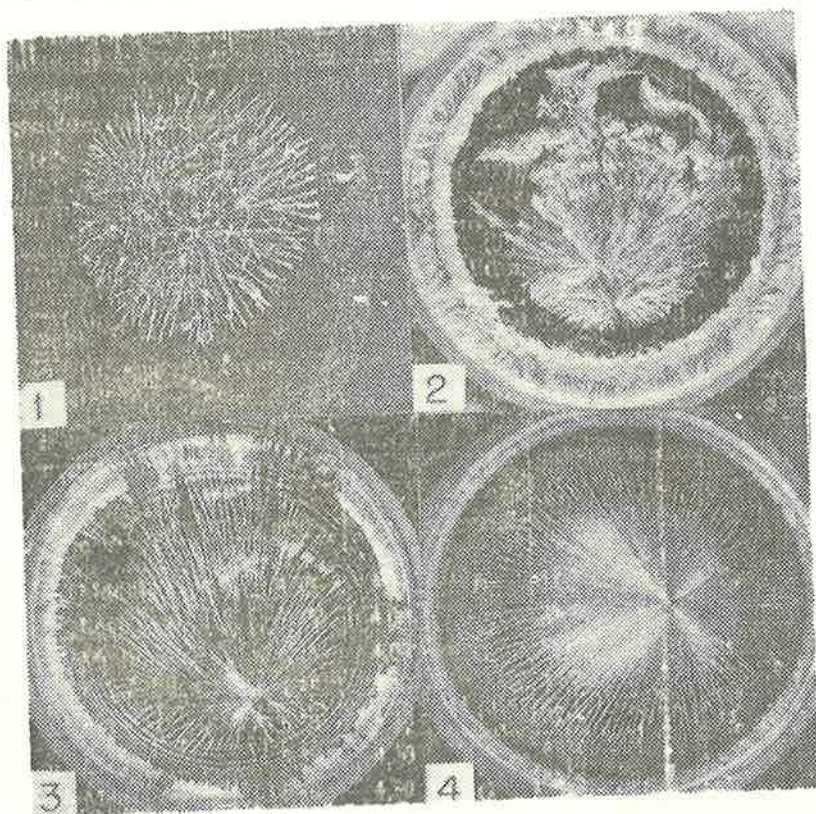
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de São Paulo — Piracicaba

MÉTODO DE PFEIFFER

Se de um sistema $H_2O-CuCl_2 \cdot 2H_2O$ o solvente é eliminado por evaporação sob condições físico-químicas constantes (T, P, UR, taxa de evaporação), os cristais do sal depositam-se segundo uma configuração que é função apenas da concentração da solução. Se se introduz no sistema uma substância X qualquer, solúvel em água, o mesmo procedimento leva a uma configuração dos cristais que é específica para a substância X. A essa configuração dá-se o nome de **modelo de cristalização** do cloreto de cobre para a substância X, que é seu **companheiro de solução**. Esse modelo de cristalização é diferente do que se obtém com qualquer outra substância e se reproduzirá sempre que se repetirem as mesmas condições físico-químicas. O mesmo comportamento se verifica, teoricamente, para qualquer sal solúvel em água, mas é o $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ o mais versátil de todos os sais na sua maneira de cristalizar na presença de diferentes companheiros de solução.

Essa capacidade de o $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ se modelar diferentemente na presença de diferentes substâncias constitui a base do **método de Pfeiffer**. Este método consiste, pois, essencialmente, na caracterização cristalogênica de soluções.

A guisa de ilustração, apresentam-se os modelos de cristalização obtidos por ABRAHÃO (1965) com cloreto de cobre sem companheiro de solução, 0,5g por placa (fig. 1), com extrato de raízes (fig. 2), de folhas (fig. 3) e de sementes (fig. 4) de feijoeiro com 0,5g de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ e 0,05g de extrato por placa.



Modelos de cristalização com cloreto de cobre

TÉCNICA EXPERIMENTAL

Dada a grande sensibilidade do $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de afetar o seu hábito de cristalização pelos mais variados fatores físico-químicos, compreende-se que a obtenção de um modelo de cristalização requer uma técnica especial, na qual cuidados devem ser tomados para que todas as condições sejam mantidas constantes, menos a que se pretende pesquisar, isto é, o efeito de um determinado companheiro de solução. Somente assim um determinado modelo pode ser atribuído a uma determinada substância.

O trabalho preliminar que precede a cristalização propriamente dita é executado em ambiente asséptico. Emprega-se, para as soluções de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e do companheiro de solução, apenas água bi-distilada. Preparadas as soluções, nas concentrações desejadas, es-

tas são levadas, já misturadas, a placas de cristalização de vidro, circulares, de 9cm de diâmetro, de fundo plano, e que, antes de receberem a solução $H_2O-CuCl_2 \cdot 2H_2O$ —companheiro de solução, são lavadas sucessivamente com NaOH, HCl, H_2SO_4 , NaF, água destilada e água bidestilada. Na placa, 6ml de solução despejados formam um filme líquido de 0,94mm de espessura. A cristalização se processa por evaporação de água das placas, sobre uma mesa de vidro, perfeitamente nivelada, no interior de uma câmara de cristalização, que permite contróle de temperatura (30°C) e de umidade relativa (60%). Essa câmara, por sua vez, localiza-se em ambiente com o mínimo de trepidação e onde o ar, antes do início da cristalização, é permanentemente renovado, filtrado, refrigerado e desumidificado. Iniciado o processo de cristalização, ao cabo de 10-12 horas toda água terá sido eliminada, restando nas placas cristais de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, dispostos segundo o modelo de cristalização próprio, obtido sempre com repetições.

RESULTADOS

Desde que PFEIFFER, em 1930, aplicou a cristalização do $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ na caracterização de extratos aquosos de tecidos animais ou vegetais, numerosos trabalhos tem sido realizados com esse método no campo médico, principalmente na Alemanha, visando a diagnose de moléstias, em particular a do câncer. Paralelamente, estudaram-se extratos de plantas de caráter medicinal. Pouco tem sido realizado no que se refere a questões agronômicas. Apresentam-se, a seguir, alguns resultados registrados na literatura sobre questões médicas e outros relativos a plantas e problemas de interêss agrônômico.

É a PFEIFFER, em 1930, que se deve o primeiro trabalho sobre diagnose por cristalização. Trabalhando com plantas e sangue obteve modelos "extraordinariamente característicos". Para sangue, observou modelos típicos para cada espécie animal, chegando, com sangue humano, a detectar diferenças causadas pela simples variação do momento de coleta de material.

TRUMPP & RASCHER, em 1936, concluem que hormônios produzem quadros de cristalização característicos. Em outro trabalho, os mesmos autôres relatam resultados de anos de pesquisas sobre diagnose de câncer, animal ou humano, de diferentes órgãos, através da cristalização com sangue, concluindo, de um total de 2.000 placas de cristalização, que se obtêm modelos característicos para a moléstia.

BÉGOUIN, em comunicação à Academia de Medicina de Paris, em 1938, apresenta resultados da aplicação do método à diagnosis de moléstias, tomando o cuidado de incumbir do reconhecimento dos modelos de cristalização um colaborador sem conhecimento prévio da origem do material. Obtem excelentes resultados na detecção de tumores malignos e benignos e de diversos tipos de tuberculose, bem como "sucessos terapêuticos impressionantes" na determinação, pelo método de Pfeiffer, do medicamento mais indicado para tratamento de moléstias diagnosticadas pela mesma via.

PFEIFFER, em 1938, estudou 72 órgãos de diferentes animais, sãos e tuberculosos, através de 216 placas de cristalização. Observou que a tuberculose se traduz no modelo como uma cruz típica, obtendo, com êsse caráter, diagnóstico correto em 186 placas (86,1%), pouco preciso em 28 (13%) e errado em 2 (0,9%).

PFEIFFER & MILEY, em comunicação ao 3.º Congresso Internacional de Câncer, em 1939, fornecem dados sobre a aplicação do método para câncer e tuberculose. Para câncer, usando sangue, o modelo característico foi encontrado em 80% de casos positivos e estava ausente em 90% das pessoas sãs.

GRUNER em 1940, introduziu a luz polarizada para exame das placas. Trabalhando com sangue, em 208 pacientes dos quais 122 com câncer e 35 com outras moléstias, confirmou, através da aplicação do método de Pfeiffer, a presença da moléstia em 90,1% das pessoas do primeiro grupo e em 96,9% das pessoas do segundo grupo confirmou sua ausência.

KREBS em 1945, também estuda a diagnose por cristalização do câncer. Usando sangue como companheiro de solução, em 150 casos e com 6 repetições, obtém os seguintes resultados; de 110 casos de carcinoma, em 86 (78%) a diagnose foi positiva, em 15 (14%) duvidosa e em 9 (8%) negativa; em 40 casos de ausência de câncer, o método de PFEIFFER confirmou 33 negativos, dando 3 duvidosos e 4 positivos.

JUNG em 1952, pesquisa o modelo de cristalização de sangue com diferentes sais. Além do cloreto de cobre, usa sulfatos de K, Na e Fe, nitratos de K e Na, alúmen de K e oxalato de amônio. Todas as pesquisas com êsses 11 sais resultaram infrutíferas. O mesmo autor, trabalhando com 21 casos de câncer, diagnostica com segurança 17 (81%) por via cristalogênica.

Além de trabalhos de natureza médica, alguns autores trabalharam com plantas. Embora em muitos casos tenham sido pesquisadas plantas medicinais, o exame desses trabalhos sugere a aplicação do método de PFEIFFER a problemas agrônômicos.

PFEIFFER em 1940, estuda diferentes órgãos de plantas sãs e atacadas por fungo, observando diferenças significativas nos modelos de cristalização. Aplica também o método ao leite fresco ou fervido, correlacionando os resultados com a perda parcial ou total do teor vitamínico, conforme o tempo de fervura.

MORRIS & MORRIS em 1938, aplicam o método de PFEIFFER a grãos de aveia, trigo e milho, amido e glicogênio. Observam que para cada espécie obtêm-se modelo característico, mas os modelos de cristalização do amido obtido a partir de cada um dos cereais não mostram diferenças aparentes. Procuram, ainda, detectar qual o componente responsável pelo modelo de cristalização, desenvolvendo técnica de concentração da fração ativa para aveia, através da qual determinam que a fração responsável pelo modelo contém 80% de polissacarídeo calculado como C₆H₁₀O₅.

Os mesmos autores em 1939, observaram serem muito semelhante os modelos de cristalização de glicogênio e extrato de milho doce. O modelo de polissacarídeo isolado de milho doce, entretanto, não é exatamente igual ao do extrato de milho doce. Pesquisando a causa dessa diferença, os autores observaram, posteriormente, em 1941, que pequenas quantidades de proteínas podem afetar sensivelmente o modelo de cristalização produzido pelo polissacarídeo. Constataram, ainda, que o efeito das proteínas é não-específico e depende mais de sua quantidade do que da relação proteína-polissacarídeo.

KRUEGER, em 1949, estuda a influência da hora da coleta de material sobre o modelo de cristalização. Para extratos de **Hvocianus niger** verifica que os modelos variam sensivelmente conforme as plantas sejam colhidas de manhã, à tarde ou à noite. Constatou entre 8, 12, 14, 18 e 24 horas uma decrescente clareza da configuração geral do modelo à medida que a coleta se faz cada vez mais tarde. Recomenda, então, que as plantas sejam colhidas pela manhã.

KRUEGER em 1950, trabalha com diferentes órgãos de algumas espécies vegetais e também com órgãos animais. A maior parte das plantas é de natureza medicinal e o autor correlaciona, sempre que possível, o modelo obtido para a planta com aquele da moléstia para a qual a planta é indicada.

Baseado em resultados anteriores, PHILIPSBORN, em 1954, propõe os termos Biocristalografia e Biomineralogia e, em 1955, em comunicação ao 3.º Congresso Internacional de Cristalografia, Paris, divide a Biocristalografia geral em 8 capítulos: morfológica, física, química, genética, funcional, diagnóstica, patológica e terapêutica e história da investigação biocristalográfica.

SELAWRY & SELAWRY, em 1957, publicam um excelente livro sobre o assunto, estudando exaustivamente pormenores da cristalização do cloreto de cobre sem companheiro de solução ou na presença de substâncias puras, minerais ou orgânicas, extratos de órgãos animais, extratos de plantas e, principalmente, sangue. Seu trabalho é baseado em cerca de 21.000 séries de cristalização, perfazendo um total de 100.000 placas. Esses autores estudam, com base em sua própria experiência, todos os aspectos referentes a técnica geral de cristalização e a melhor maneira de obtenção de extratos aquosos de órgãos animais ou vegetais. No capítulo referente a plantas, os autores relatam resultados obtidos com 250 séries, num total de 1.500 placas. A maior parte das plantas é medicinal, mas alguns dados são fornecidos também para plantas de interesse econômico. Assim, relatam diferenças de modelo de cristalização obtidos para ervilha, adubada mineral ou orgânicamente ou colhida de solos arenosos ou argilosos.

ABRAHÃO, em 1965, partindo da premissa de que, sendo os problemas agrônômicos em grande parte biológicos, o método de PFEIFFER deve se mostrar para questões relativas às plantas econômicas tão fecundo quanto para questões médicas, aplica a cristalização do cloreto de cobre ao feijoeiro. Em face da sensibilidade do cloreto de cobre e de resultados assinalados por SELAWRY para ervilhas, utiliza plantas obtidas de soluções nutritivas completas, coletadas segundo recomendações de KRUEGER. Trabalhando segundo as exigências técnicas de Selawry, estuda diferentes órgãos (raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes) de 3 variedades (prêto, pintado e roxinho) em diferentes estágios de desenvolvimento das plantas. Ao final das 130 séries de ensaios, com um total de 472 placas, determina a melhor concentração para ensaios comparativos, o que permite estabelecer modelos gerais para cada órgão. Constata também a nítida influência que a idade da planta exerce sobre o modelo e observa que as melhores possibilidades na distinção entre variedades residem nos modelos de flores e sementes. Assinala, ainda, que de um modo geral, é possível estabelecer de 10 a 12 diferenças significativas entre os caracteres morfológicos de modelos de cristalização obtidos de placas cristalizadas simultaneamente e que podem ser estabelecidas com segurança utilizando-se 5 repetições para soluções de mesma composição.

CONCLUSÕES

Os resultados assinalados em vasta literatura referente principalmente a problemas médicos e a experiência adquirida pelo próprio autor permitem concluir que o método de PFEIFFER tem, no campo agrônômico, um vasto, promissor e fecundo campo de pes-

quisas. Os simples resumos apresentados de resultados obtidos é suficiente para que venha à luz um grande número de sugestões sobre a aplicação do método a animais ou a plantas. Ademais, trata-se de método cuja aplicação, embora exija técnica experimental rigorosa, é segura e simples, garantindo aos resultados uma validade estatística que o uso de repetições apenas reforça.

RESUMO

O presente trabalho consiste em considerações sobre o método de PFEIFFER, a técnica experimental implicada e em especial, na apresentação de alguns resultados registrados na literatura sobre o emprego do método a problemas médicos e agrônômicos. O autor sugere que se amplie a pesquisa sobre a sua aplicação a questões agrônômicas.

BIBLIOGRAFIA

- ABRAHÃO, I. O., 1965 — **Cristalogênese do cloreto de cobre. Aplicação do método de Pfeiffer ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**, tese de doutoramento apresentada à ESALQ, 134 págs.
- BÉGOUIN, M. P., 1938 — Quelques résultats de la méthode des cristallisations de Pfeiffer dans le diagnostic du cancer et de la tuberculose. **Bulletin de l'Académie de Médecine, Paris**, Vol. 119, n. 25, 746-749.
- GRUNER, O. C., 1940 — Experience with the Pfeiffer crystallization method for the diagnosis of cancer. **Canadian Medical Association Journal**, Toronto, Canadá, Vol. 43, n. 2, 99-106.
- JUNG, H., 1952 — Beitrage zur Kristallographischen Blutuntersuchung. Die Pharmazie. Ministerium Gesundheitswesen, Berlin, Alemanha, Heft 10, 628-639.
- KREBS, W., 1947 — Ein Beitrag zur Kristallographischen Karzinom-Diagnostik nach E. Pfeiffer. **Helvet. Chir. Acta**, 114, n. 2, 232-239.
- KRUEGER, H., 1949 — Tagezeiten-Rhythmen bei Pflanzen. **Weleda-Nachrichten** 22, 8-11.
- KRUEGER, H., 1950 — Kupferchlorid — Kristallisationen, ein Reagens auf Gestaltungskraefte des Lebendigen. **Weleda-Schriftenreihe**, Heft 1, 5-30.

- MORRIS, DANIEL LUZON & C. T. MORRIS, 1938 — Specific effects of certain tissue extracts on the crystallization pattern of cupric chloride. **Journal of Physical Chemistry** 43, 623-629.
- MORRIS, DANIEL LUZON & C. T. MORRIS, 1939 — Glycogen in the seed of *Zea mays* (variety golden bantam). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, U.S.A. Vol. 130, 535-544.
- MORRIS DANIEL LUZON & C. T. MORRIS, 1941 — The modification of cupric chloride crystallisation patterns by traces of proteins **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore. U.S. A., Vol. 141, 515-521.
- PFEIFFER, E., 1930 — **Kristalle**, Orient-Occident — Verlag, Stuttgart, Alemanha, 81 p.
- PFEIFFER, E., 1938 — Ueber die Beeinflussung des Kristallisationsbilde des Kupferchlorides durch tuberkulooses Material. **Muenchener Medizinische Wochenschrift** 3, 92-94.
- PFEIFFER, E., 1940 — **Sensitive Crystallization**, **Chemical Products and the chemical news**, Londres, n. 3, 21-25.
- PFEIFFER, E. & G. P. MILEY, 1939 — The influence of blood of malignant and non-malignant origin upon the crystallization of copper chloride. 3.o Congresso Internacional de Câncer, Atlantic City, pg. 198.
- PHILIPSBORN, H. V., 1954 — Biomineralogie. **Fortschritte der Mineralogie** 32, 11-25.
- PHILIPSBORN, H. V., 1955 — Biocristallographie. **Bulletin de la Société Française de Minéralogie et de Cristallographie**, LXXXVIII, 267-274.
- RASCHER, S. & J. TRUMPP, 1939 — Versuch einer Kristallographischen Karzinomdiagnose. **Muenchener Medizinische Wochenschrift** 86, n. 14, 544-545.
- SELAWRY, A. & O. SELAWRY, 1957 — **Die Kupferchloridkristallisation in Naturwissenschaft und Medicin**. Gustav Fischer — Verlag, Stuttgart, Alemanha, 232 p.
- TRUMPP, J. & S. RASCHER, 1936 — Nachpruefung der E. Pfeiffer'schen Angaben ueber die Moeglichkeit einer Kristallographischen Diagnostik; Versuch einer Hormonoskopie und Schwangerschaftsdiagnose. **Muenchener Medizinische Wochenschrift** 83, n. 26, 1.048-1.051.