

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

**CRISTALIZAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO EM
SUPORTES SÓLIDOS.**

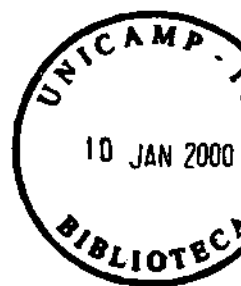
Wilson Sueoka

Dissertação de Mestrado

Profa. Dra. Inés Joeques

Orientadora

Agosto de 1999



UNIDADE	IC
N.º CHAMADA:	110111camp
	Su24c
V.	Ex.
TOMBO BC/	39627
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02-12-99
N.º CPD	

CM-00137158-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Su24c Sueoka, Wilson
Cristalização de carbonato de cálcio em suportes sólidos / Wilson Sueoka. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadora: Inés Joeques.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

1. Anéis de Liesegang. 2. Carbonato de cálcio. 3. Calcita.
4. Biomineralização. I. Joeques, Inés. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Este trabalho é dedicado à minha família como um todo e à Akie, que mesmo distantes sempre estiveram em meus pensamentos. E, de uma forma especial, à Connie e ao 'Limeira'.

Agradecimentos

À minha orientadora, Inés pela extrema liberdade em desenvolver e modificar o projeto que resultou neste trabalho. Como ela disse certa vez: “Você é um louco, mas eu também sou louca, vá em frente!”;

À Flávia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP, pelas micrografias eletrônicas de varredura;

Ao Prof. Dr. Lisandro Cardoso e ao J. Alfredo Freymann (técnico), do Laboratório de Difração de Raios-X - IFGW - Unicamp, pelas análises de raios X;

Ao corpo técnico do Instituto de Química, especialmente à Ercília;

Aos integrantes do grupo, pelo apoio nestes anos de convivência, com os quais obtive um aprendizado que dificilmente poderei retribuir (especialmente à Nádia);

Aos professores Volpe, Ulf e Carol, pelo apoio e atenção especial a que me concederam (além dos reagentes);

Aos amigos: Klaus, “Virso”, Ricardo, Gunther, Bete e Zé, Zoéga, Rosa e Ricardo, Marcelo, Jana e Victor, Mário e muitos, muitos outros, com quem pude ter discussões extremamente proveitosas por termos formação acadêmica totalmente distintas umas das outras;

À SAMA – Mineração de Amianto, S.A., pela bolsa concedida no início do projeto;

À CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos,

Muito obrigado!

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
1. Introdução.....	1
1.1. Biominerais.....	1
1.2. Anéis de Liesegang.....	7
1.3. Objetivos.....	12
2. Experimental.....	13
2.1. Material e equipamentos.....	13
2.2. Métodos.....	14
2.2.1. Cristalização de CaCO_3 em solução aquosa.....	14
2.2.2. Cristalização de CaCO_3 em suportes sólidos.....	16
2.2.3. Cristalização de CaCO_3 em gel.....	19
3. Resultados.....	23
3.1. Cristalização em solução.....	23
3.2. Cristalização em suportes sólidos.....	27
3.3. Cristalização em gel.....	29
4. Discussão.....	41
4.1. Cristalização em solução.....	41
4.2. Cristalização em suportes sólidos.....	43
4.3. Cristalização em gel.....	45
5. Conclusão.....	48
6. Bibliografia.....	50

CRISTALIZAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO EM SUPORTES SÓLIDOS.

Dissertação de Mestrado de Wilson Sueoka

Orientação: Profa. Dra. Inés Joeques

Instituto de Química – Unicamp – Caixa postal 6154

13083-970 Campinas – S.P. – Brasil.

Resumo

Nas últimas décadas, tem sido crescente o interesse em se estudar o modo como os biominerais se formam e também métodos de se obter materiais sintéticos análogos (síntese biomimética). Este interesse é justificado pelas potencialidades de aplicação em próteses, cerâmicas e revestimentos, devido às suas características químicas e mecânicas.

Neste trabalho foi explorada a cristalização de CaCO_3 a partir de uma solução supersaturada de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ na própria solução e em suportes sólidos (parafina, polietileno e membrana de ovo). Também foi estudada a cristalização do CaCO_3 em gelatina de ágar, onde os sólidos formados foram analisados por técnica de difração de raios-X e observou-se a morfologia por microscopia eletrônica de varredura.

Em solução foram obtidos cristais de calcita e, quando da adição de MgCl_2 , obteve-se cristais com hábitos diferentes. Nos suportes sólidos foi observado a formação de cristais de calcita sobre a superfície destes substratos de forma parcial e desorganizada. Em gelatina de ágar foi observado a precipitação de CaCO_3 de forma descontínua e periódica (anéis de Liesegang) e, em alguns casos, foram de forma contínua. A técnica de microscopia eletrônica de varredura mostrou que a presença de MgCl_2 na reação de precipitação, de fato, altera o hábito dos cristais formados

-Palavras-chave: carbonato de cálcio, calcita, aragonita, biomineralização, biomimética, anéis de Liesegang.

"CALCIUM CARBONATE CRYSTALLIZATION ON SOLID MATRIXES."

Master Thesis of Wilson Sueoka

Advised by Prof. Inés Joekes

Instituto de Química – Unicamp – Caixa postal 6154

13083-970 Campinas – S.P. – Brasil.

Abstract

The studies of biomineral formation and methods to obtain synthetic analogues (biomimetic synthesis) are increasing. These materials have potential applications in prosthesis, ceramics and welding devices due to their enhanced chemical and mechanical properties. In this work the CaCO_3 crystallization in aqueous solution was obtained by precipitation from $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ supersaturated solution. Also, CaCO_3 crystallization was obtained on solid matrixes (polyethylene, paraffin and eggshell membranes). The CaCO_3 precipitation in agar gelatin was studied; the solids were analyzed by X-ray diffractometry and the morphology was observed by scanning electron microscopy. In the solution experiments, calcite crystals were obtained. Different crystalline habits were observed by adding MgCl_2 . In solid matrixes, calcite crystals formed in chaotic dispositions. In agar gelatin, periodic precipitation phenomena (Liesegang's rings) were observed and, in some cases, in continuous form. Also, the addition of MgCl_2 affects the crystalline habit.

-Keywords: Calcium carbonate, calcite, aragonite, biomineralization, biomimetics, Liesegang's rings, periodic precipitation.

Para alguns de nós o estranho desses mundos é em si maravilhoso; possui o encanto do exótico. Estou convencido de que uma das coisas que atrai os homens para a pesquisa científica é exatamente esta fascinação pelo exótico. Não há dúvida de que existem várias razões por que estudamos a natureza; o desconhecido não é a única razão ou a mais importante. Ao lado da razão prática, suponho que haja razões básicas mais pessoais no meditar os fatos e prová-los, pois afinal, estamos apenas tentando compreender o mundo onde vivemos.

C. Bunn - "Cristais - Seu papel na natureza e na ciência"

1 – Introdução

1.1. Biomínerais

Atualmente os métodos utilizados na cristalização de sais inorgânicos são baseados em princípios empíricos, onde se controla a mudança da temperatura, a força iônica e o solvente. Em tais métodos, a estrutura e o tamanho do cristal podem ser induzidos pelo nível de saturação e aditivos empregados, mas o grau de especificidade cristal química é geralmente baixo e não muito previsível[1]. Já em materiais originários de sistemas vivos, como ossos e conchas, que consistem em macromoléculas orgânicas (colágeno e quitina), impregnados de cristais inorgânicos (fosfato e carbonato de cálcio, respectivamente), o controle da formação de cristais com orientação preferencial é bastante comum, assim como a composição e morfologia dos mesmos é diferente das encontradas em precipitados de origem não-biológica. Tal especificidade é explicada pela presença das macromoléculas, que, ao nível molecular, controlam a nucleação, o hábito e o ordenamento dos cristais. Além disso, estas macromoléculas exercem importante influência nas propriedades biomecânicas nestes materiais[1,2].

Em sistemas vivos, a escolha dos elementos constituintes é regida por quatro fatores: abundância, eficiência, conveniência e aumento da eficiência/especificidade evolutiva[3]. Levando em conta estes fatores, os compostos de cálcio são os mais adequados para funções estruturais e de proteção, com boas propriedades de resistência a impacto, flexão e leveza; além de serem sintetizados a pressão e temperatura ambientes[4, 5]. Dentre os compostos de

cálcio encontrados em seres vivos, se limitará apenas ao carbonato de cálcio, objeto de estudo deste trabalho.

Os tipos polimórficos de carbonato de cálcio (CaCO_3), formados biologicamente e mais comumente encontrados são a calcita e a aragonita, enquanto que a vaterita, menos estável, não é normalmente formada por organismos[2]. A calcita é termodinamicamente mais estável à pressão e temperatura ambientes do que a aragonita[6], mas ambas têm estruturas cristalinas similares, onde os íons cálcio estão localizados próximos às mesmas posições reticulares, alternadas por camadas de carbonato (figura 01b). A maior diferença entre estes pares polimórficos ocorre na organização e orientação do carbonato. A aragonita apresenta um empacotamento reticular mais denso e sob condições normais de temperatura e pressão (figura 01a), se cristaliza em forma de agulhas (cristais aciculares, figura 02a), sem se converter em cristais grandes e com tendência a formar aglomerados esferulíticos de alta porosidade. A calcita, por outro lado, se cristaliza em romboedros, formando grandes cristais (figura 02b). Devido ao seu empacotamento, apresenta planos de clivagem por onde uma trinca se propaga com muita facilidade, apresentando fraca resistência mecânica, sendo extremamente quebradiça. A aragonita, não possuindo planos de fácil clivagem, se mostra mais resistente a trincas[5].

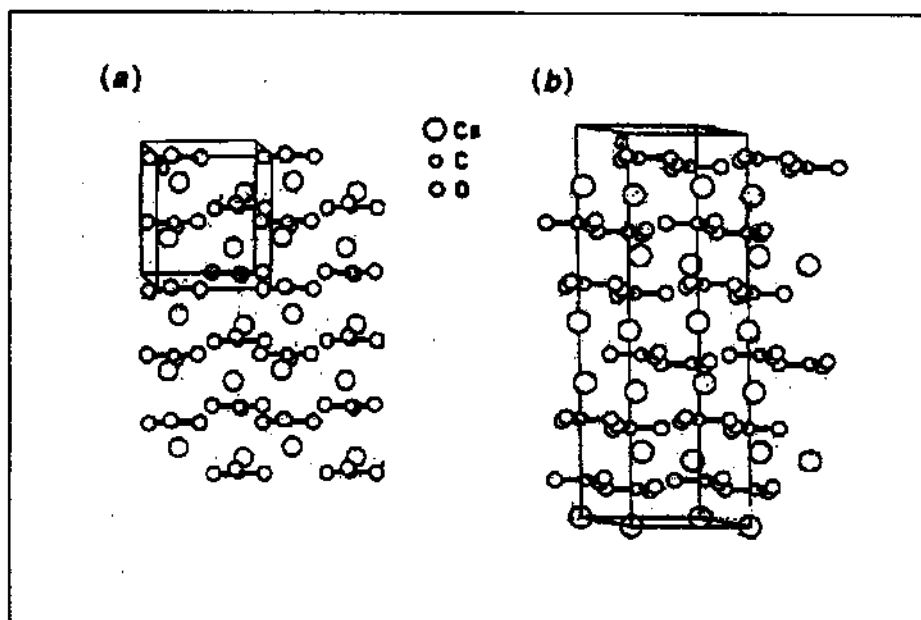


Figura 1: Estrutura cristalina da aragonita (a) e calcita (b) [fonte: ref. 5].

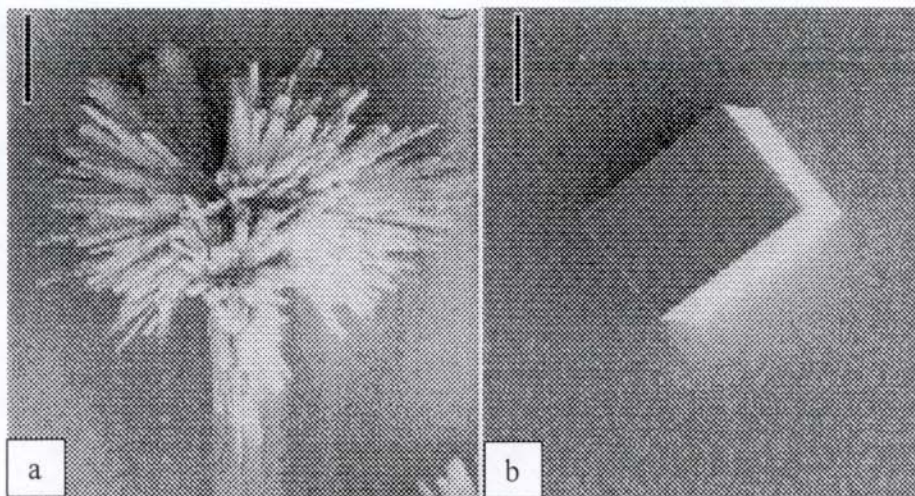


Figura 02: Micrografia Eletrônica de Varredura de cristais de aragonita (a) e calcita (b), a barra de aumentos corresponde a 20 μm [fonte: ref. 50]

De acordo com Kitano [7], a presença de outros íons de carga dupla na solução de CaCO_3 , em particular Mg^{++} , bem como uma variedade de pequenas moléculas orgânicas, favorecem a formação de aragonita. Desta forma, acredita-se que a regulação do polimorfismo aragonita-calcita em organismos dependa da concentração dos íons presentes, principalmente Mg^{++} , na solução precipitante[2], existindo até modelagem teórica sobre os efeitos deste íon[8]. Além deste fator, determinadas moléculas orgânicas também interferem na formação destes cristais, alterando sua solubilidade e forma[4, 9]. Assim, o entendimento do processo biológico de controle da cristalização pode levar a possibilidade de se obter mecanismos análogos, aplicáveis em síntese inorgânica [1, 3].

O estudo deste assunto é de grande interesse na área de biologia estrutural, medicina, crescimento de cristais, ciência do estado sólido e tecnologia de materiais. Como aplicações a longo prazo, podemos destacar a confecção de próteses, filtros, compreensão da formação de dentes, ossos, cálculos renais, síntese controlada de insumos de eletrônica e catálise, matérias-primas para engenharia e mineração marinha[10, 11,12].

Neste sentido, diversos trabalhos já foram publicados no campo da biomineralização, visando a sua compreensão. Recentemente foram publicados artigos com ensaios biomiméticos utilizando proteínas extraídas de conchas marinhas e ácidos carboxílicos específicos[13, 14], além de introduzir lâminas de vidro em abalones vivos (*Haliotis*

rufescens), sobre as quais houve deposição de material perolado ("pérolas chatas")[15]. Os estudos de biomineralização vão desde cristais de dióxido de silício em plantas, passando por estatólitos em insetos, dentição de ratos, à formação de conchas marinhas[15-21], assim como os possíveis mecanismos[12, 22-24]. Há consenso de que determinadas proteínas exercem importante fator na orientação dos cristais formados, possivelmente através de efeito eletrostático, dirigindo o arranjo cristalino[1, 25]. As tentativas de biomimetizar o fenômeno são significativas; existem referências que relatam o uso de líquido circulante do interior de bivalves[26, 27] e um similar artificial deste líquido, discutindo os efeitos de aminoácidos, magnésio e do próprio líquido, incluindo efeitos de inibição[22]. Com o mesmo intuito, outro artigo relata o uso de quitina e fibroína de seda, como suporte de crescimento dos cristais [2, 28]; ainda outros descreveram sobre o uso de materiais de origem não-biológica, como suportes para a cristalização de CaCO_3 *in vitro*, tais como vidro e poliestireno modificado, em cujas superfícies foram ancoradas proteínas[24, 29]. Trabalhos publicados em literatura por diversos autores levam a crer que determinadas proteínas interferem no crescimento da estrutura cristalina dos compostos inorgânicos, com orientação, morfologia e hábito dos cristais bastante específicos. Porém, ainda há muito a ser esclarecido a respeito do mecanismo de deposição e sobre as variáveis embutidas no fenômeno [1, 15, 27].

O modelo teórico[22, 29] mais aceito atualmente para explicar o direcionamento preferencial de crescimento dos cristais de carbonato de cálcio parte da constatação de que a matriz protéica envolvida na construção destas estruturas possui principalmente resíduos aspartato e glicina, predominando a sequência Asp-X-Asp-X (18-38 %, sendo X=serina ou glicina) na matriz protéica associada à formação de calcita. Nos casos onde se observaram a presença de aragonita, foram constatados menor quantidade da sequência Asp-X-Asp-X (8-14 %). Desta constatação foi proposto que a sequência Asp-X-Asp-X atua como direcionador na mineralização, complexando com os íons Ca^{++} na forma indicada pela figura 03:

Como exemplo ilustrativo de trabalhos recentes na área de biominerais, tem-se o artigo de Addadi e colaboradores[28], cuja equipe vem apresentando trabalhos nesta área de pesquisa e cujos resultados concordam com o modelo apresentado.

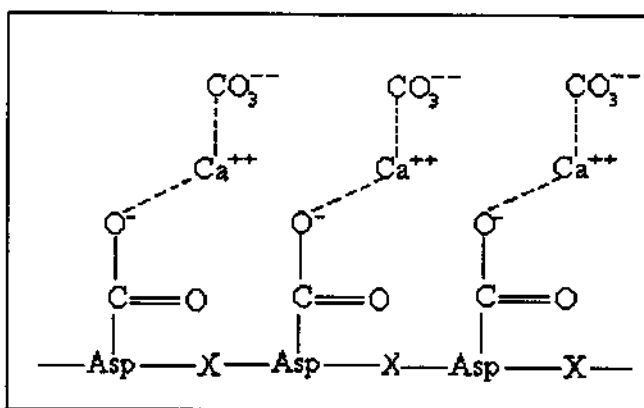


Figura 03: Modelo esquemático de como a sequência Asp-X-Asp-X direciona a mineralização de CaCO_3 , os grupos carboxílicos fazem parte da estrutura do resíduo aspartato, aqui omitidos para simplificar o desenho..

Experimentalmente, os autores extraíram proteínas presentes em conchas de *Atrina serrata* por métodos químicos, isolando diferentes frações por cromatografia de alto rendimento. As frações isoladas foram adsorvidas em β -quitina extraída de lulas, previamente tratada com fibroína de seda. A β -quitina purificada quimicamente foi tratada com solução de CaCl_2 (10 mmol.L^{-1}), sobre a qual adsorveu-se fibroína de seda (solução a 2%). Após este tratamento o substrato foi imerso em solução de CaCl_2 (10 mmol.L^{-1}) contendo as proteínas ($10\text{-}100 \text{ nmol.mL}^{-1}$) por 12 h. O material resultante foi colocado dentro de um dessecador, onde permaneceu por dois dias em presença de carbonato de amônio. Os cristais de carbonato de cálcio se formavam no interior do substrato, pela reação entre o CaCl_2 e o $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ difundido pela atmosfera interna do dessecador. Método análogo foi utilizado para experimentos com polipeptídeos sintéticos

Neste trabalho, a seção de resultados está dividida em 3 partes. Na primeira parte, os autores indicam a caracterização estrutural do complexo de macromoléculas quitina em matriz de seda, e também descrevem o resultado de marcação de proteínas adsorvidas em poliestireno, na quitina e na estrutura formada de quitina e fibroína de seda. A análise por microscopia de fluorescência, utilizando isotiocianato de rodamina, monitorada e comparada entre estes sistemas. Em poliestireno não foi observada nenhuma fluorescência, sobre a quitina, observou-se baixa fluorescência, já o conjunto seda e quitina, mostrou intensa fluorescência.

Na segunda parte é relatado o isolamento de frações macromoleculares responsáveis pela nucleação de aragonita. O processo consiste na extração de macromoléculas incorporadas

à camada nacarada da concha do molusco denominado *Atrina serrata*. Foi utilizado um método recentemente desenvolvido de troca iônica para dissolução do mineral na ausência de qualquer agente quelante ou condições ácidas denaturantes. O rendimento de proteínas foi de aproximadamente 0,01 de aminoácidos por massa unitária de mineral, com as seguintes composições típicas dos principais aminoácidos (% em moles de proteína total) Asp (25), Gly (18), Ser (14), Ala (9) e Glx (8). Os componentes do montante de macromoléculas foram separados por fracionamento, utilizando cromatografia líquida de alto rendimento, em uma coluna de troca iônica. Cada fração foi adsorvida em separado sobre o substrato composto de quitina e fibroína de seda.

Dos tratamentos resultou que determinadas frações induziram a formação de vaterita e calcita sobre a superfície do substrato, enquanto que outras frações induziram a produção de aragonita principalmente. As observações via MEV mostram que o complexo seda-quitina e o mineral estão intimamente associados, com cada cristalito mantendo contato com a matriz orgânica. Esses cristalitos se mostraram na forma de agulhas de aproximadamente 1-2 μm de comprimento. Este fato contrasta com o resultado obtido quando se utilizava todas as macromoléculas simultaneamente, que produziram cristais elípticos com tamanhos na faixa de 100 a 300 nm. Foi observado localmente uma orientação preferencial dos cristalitos em forma de agulhas, mas nunca se observou cristalização massiva de aragonita no conjunto como um todo das macromoléculas. Acima de tudo, com o objetivo de induzir a nucleação de aragonita pelo conjunto total de proteínas, pelo menos 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteína foi usado na etapa de adsorção, sendo que em concentrações menores produziu-se misturas de calcita e aragonita, não havendo cristalização dentro do substrato quando da ausência de proteína adsorvida, indicando que a formação de aragonita se dá através de nucleação seletiva nesta fase, bem como a inibição de calcita.

Na terceira parte, os autores utilizaram análogos sintéticos de macromoléculas polipeptídicas como agente nucleante. A escolha dos polipeptídeos foi baseada na observação de que as macromoléculas presentes nos tecidos mineralizados mostravam alta concentração de ácido aspártico, bem como locais onde há grande concentração de ácido glutâmico. Deste modo, foram escolhidos ácido poli(Asp-Leu), poli(Leu-Asp-Asp-Leu), poli(Leu-Glu), poli(Leu-Glu-Glu-Leu), poli(Asp) e poli(Glu) e outros contendo séries repetitivas do resíduo de ácido glutâmico.

. Poli(Asp) e poli(Glu) mostraram massiva deposição de esferulitos (100 a 400 por 25 mm²) dentro da quitina, com nenhuma ou pouca cristalização sobre a superfície ou em torno do substrato. Tanto a aragonita quanto a calcita se formaram, tendo no caso de poli(Asp), nove casos entre quinze onde esferulitos de aragonita foram mais abundantes, enquanto que no poli(Glu), predominantemente houve formação de calcita (6 casos em 9). O exame por MEV dos esferulitos de aragonita mostraram cristalitos isolados na forma de bastões alongados de 100 a 200 nm. Os cristalitos de calcita mantiveram a típica morfologia romboédrica de calcita sintética, com dimensões em torno de 400 nm.

Quando se utilizou poli(Asp-Leu), os esferulitos se formaram dentro da quitina em apenas 4 de 12 experimentos, porém, nesse caso, os cristais eram compostos exclusivamente de aragonita na forma de agulhas alongadas, similares às obtidas a partir da fração protéica na qual foi observada massiva deposição de aragonita, descrita na segunda parte desta seção.

Com estes resultados experimentais os autores elucidam aspectos importantes no processo de biomineralização, tais como a difusão de íons e macromoléculas, adsorção e justaposição de proteínas. Também discutem sobre a necessidade de se criar um microambiente que reproduza, pelo menos em parte, o encontrado em sistemas biológicos onde ocorre a biomineralização. Constatam a importância da presença de determinadas macromoléculas orgânicas (proteínas), confirmando a participação destas como direcionadores estruturais na formação de biominerais, induzindo a formação de aragonita.

1.2. Anéis de Liesegang[30]

O fenômeno da precipitação periódica, ou anéis de Liesegang é conhecido há muitos anos, sendo a sua descoberta atribuída a Raphael E. Liesegang, tendo o seu nome assim, relacionado ao fenômeno. Na experiência original de Liesegang[31], um cristal de nitrato de prata (AgNO_3) era colocado sobre uma lâmina de vidro recoberta com uma solução diluída de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) em gelatina. O precipitado de dicromato de prata ($\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) não se formava continuamente a partir do cristal de nitrato de prata, como seria de se esperar, mas era caracterizado pela presença de espaços vazios, ou seja, formava-se em bandas concêntricas, ou anéis em torno do cristal.

A variedade de substâncias que formam anéis é enorme, tendo-se afirmado que todas as reações que produzem precipitado poderiam ocorrer ritmicamente, quando sujeitas às condições adequadas. Apesar da afirmação parecer um pouco ambiciosa, o número de reações que dão origem ao fenômeno da precipitação periódica é realmente grande.

Isemura[32] apresenta uma lista de mais de 30 reações em gelatina, enquanto Morse [33] analisa vinte e seis reações que manifestam periodicidade em soluções aquosas.

As experiências sobre os anéis são, em geral, ou efetuadas em tubos de ensaio, levando à formação de bandas verticais ou em placas horizontais, onde são obtidos anéis concêntricos, como nas experiências originais de Liesegang. Na figura 04 é apresentado um desenho esquemático de como este fenômeno se apresenta visualmente.

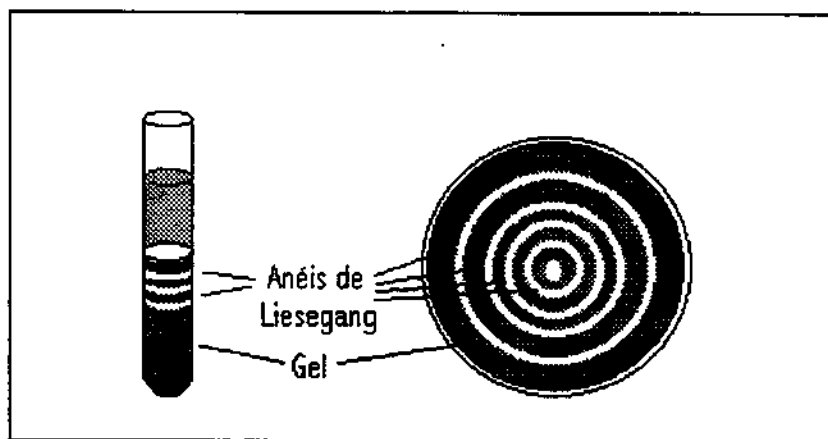


Figura 04: Desenho esquemático do fenômeno denominado “anéis de Liesegang”. À direita em placas de petri e à esquerda em tubos de ensaio.

Na maioria das experiências, utiliza-se um gel como meio dispersante; um dos reagentes é adicionado ao gel antes deste se solidificar, sendo geralmente chamado de eletrólito interno. Após a solidificação do gel, o outro reagente (eletrólito externo) é colocado no topo do tubo (ou no centro do disco); difundindo-se através do gel a partir da interface de contato gel-eletrólito externo, formando uma região contínua da precipitação e, após essa região, obtém-se as bandas descontínuas.

A utilização de géis deve-se, basicamente, à sua característica de evitar a ocorrência de correntes convectivas, o que facilita a execução das experiências.

Outros fatores importantes são as concentrações do eletrólito interno e externo. Normalmente, afirma-se que a concentração do eletrólito externo deve ser significativamente maior que a do eletrólito interno. Realmente, observa-se que, quanto maior a concentração do eletrólito externo, maior o número de anéis formados e menor a distância entre eles, tornando-se contínua a precipitação para concentrações muito altas [31].

Algumas observações indicam que um parâmetro importante seria a diferença entre a concentração dos dois eletrólitos e os seus valores absolutos. Em geral, qualquer dos dois reagentes pode ser feito eletrólito externo ou interno, apesar de em alguns casos ocorrerem alterações devido a essa troca.

Com relação à temperatura, tanto a solubilidade do precipitado como a velocidade de difusão são influenciadas, o que leva a uma alteração na estrutura dos anéis. Com o aumento da temperatura, menos bandas são formadas e a distância entre elas aumenta, apesar do inverso ocorrer em certos casos. Outros fatores que também podem influenciar a formação dos anéis é a presença de impurezas no gel e o valor do pH.

Outra característica importante dos anéis é que a medida que a distância entre o ponto de contato entre os eletrólitos e o ponto inicial aumenta, aumenta o intervalo entre os anéis. Existem casos onde há inversão deste comportamento, ou seja, a medida que a distância aumenta há uma redução gradual do intervalo entre os anéis.

Alguns pesquisadores relataram a formação de partículas coloidais antes do aparecimento dos anéis, levantando a questão de que a formação destes seria ou um fenômeno de pré-nucleação (onde o local de formação dos anéis seria determinada por eventos anteriores à nucleação), ou de pós-nucleação (onde inicialmente ocorreria a nucleação ao longo de toda a solução e posterior formação dos anéis).

A questão da formação de uma dispersão coloidal anterior ao aparecimento dos anéis surgiu como consequência da teoria de coagulação, que supunha que a precipitação era ocasionada pela coagulação de partículas coloidais. Apesar desta teoria ter sido usada em alguns trabalhos para explicar dados experimentais, aparentemente não possui atualmente mais adeptos.

A idéia da pré-nucleação antes da fase precipitada entretanto, não foi abandonada, tendo sido realizados alguns estudos para comprová-la. O fato da formação dos anéis de

Liesegang ser um fenômeno de pré ou pós-nucleação, crucial do ponto de vista teórico, vem sendo ainda objeto de discussão.

Modelo teórico

Os modelos têm, em geral, procurado descrever a formação dos anéis através de mecanismos envolvendo a difusão, reação química e posterior precipitação. Ostwald[36] explica o fenômeno de formação de anéis com aumento de espaçamento entre eles utilizando um modelo conhecido como Teoria de Supersaturação. Flicker e Ross[43], tentaram explicar aqueles nos quais há redução do espaçamento, por meio de um mecanismo de pré-nucleação; Bradford[45], tentou explicar a existência dos espaços vazios entre os anéis como sendo causados pela adsorção do eletrólito interno pelo precipitado. Já Dahr e Chatterji[46], levantaram a hipótese de que o precipitado seria produzida por uma dispersão coloidal que, por difusão, daria origem às bandas por adsorção entre as partículas (teoria de pós-nucleação). Shinohara[47], revisou a teoria de Dahr e Chatterji, eliminando a necessidade da difusão das partículas coloidais, propondo um mecanismo de floculação das partículas coloidais.

Apesar de tantos estudos sobre o fenômeno, ainda hoje não há um consenso sobre o mecanismo[30]. Aqui, é apresentado apenas um modelo cuja idéia básica ainda é utilizada em inúmeras publicações e que se adequa a este trabalho; conhecido como Modelo de Supersaturação, publicado em 1897 por Wilhelm Ostwald[36].

Ostwald supôs que a precipitação não ocorria imediatamente à formação do produto, mas somente após atingir um certo grau de supersaturação. Em outras palavras, haveria a difusão dos íons do eletrólito externo no gel, ocorrendo reação entre este e o eletrólito interno, aumentando o valor do produto de solubilidade até que, em algum ponto atrás da frente de difusão, o valor crítico de supersaturação seria atingido, provocando a precipitação do produto de reação neste local. Os íons em solução, em torno deste local, difundir-se-iam para o núcleo de precipitação, diminuindo sua concentração nas regiões vizinhas, impedindo a precipitação nestes locais, onde o valor crítico de supersaturação não seria atingido. A partir deste momento, reiniciava-se o mesmo processo, difusão, supersaturação e precipitação em um

ponto mais adiante; tendo como ponto de partida o primeiro anel, considerado como uma nova origem de contato entre os eletrólitos.

Este processo se repetiria, formando uma série de bandas e, à medida que isto ocorre, as concentrações dos reagentes diminuem, provocando um aumento na separação entre as bandas.

Bauer, utilizando uma analogia à equação de condução de calor, propôs para a difusão de íon em gel a equação[32]:

$$\delta u / \delta t = a^2 . (\delta^2 u / \delta X^2)$$

onde: u = íon difundindo de um líquido para o gel a^2 = constante de difusão
 X = espaçamento entre os anéis t = tempo

A partir desta equação se obtém uma base matemática para a teoria de supersaturação de Ostwald, onde a razão entre o intervalo entre a n -ésima e a $(n+1)$ -ésima banda pode ser dado por:

$$\Delta X_{n+1} / \Delta X_n = 1 + p$$

sendo p :

$$\Delta X / X^* \sim \Delta t / 2 . t^* = p \sim \text{constante}$$

onde t^* é o tempo necessário para formar o precipitado e X^* a distância do local de formação do mesmo. Se o intervalo entre a interface ("stopper") e a primeira banda é dado por ΔX_0 , pode se escrever a série:

$$\Delta X_1 / \Delta X_0 = 1 + p, \quad \Delta X_2 / \Delta X_1 = 1 + p, \dots \quad \Delta X_n / \Delta X_{n-1} = 1 + p$$

dá a relação:

$$\Delta X_n / \Delta X_0 = (1 + p)^n$$

se o lado direito é expandido por teorema binomial, obtém-se:

$$\Delta X_n / \Delta X_0 = \{1 + n.p + [n(n-1)/2!]p^2 + [n(n-1)(n-2)/3!]p^3 + \dots\}$$

ignorando os termos maiores devido a p ser pequeno:

$$\Delta X_n = \Delta X_0 \{1 + n.p + [n(n-1)/2]p^2\}$$

ou:

$$\Delta X_n = \Delta X_0 + \Delta X_0(1 - p/2)p.n + (\Delta X_0/2)p^2 n^2$$

como ΔX_0 e p são constantes, podem ser denotados como:

$$\Delta X_0 = a, \quad \Delta X_0(1 - p/2)p.n = b, \quad (\Delta X_0/2)p^2 n^2 = c$$

que fornece a equação quadrática observada empiricamente:

$$\Delta X_n = a + bn + cn^2.$$

Novamente, ressalta-se que este modelo se aplica apenas ao observado neste trabalho, não se aplicando a todos os casos de formação de anéis, havendo vários outros modelos[30].

1.3. Objetivos

O objetivo deste trabalho é estudar a cristalização de carbonato de cálcio em solução, sua adesão em suportes sólidos (parafina, polietileno e membrana de ovo), a influência da adição de cloreto de magnésio na morfologia dos cristais e, principalmente, a obtenção de agregados policristalinos associados a material orgânico (albumina, colágeno, ágar), com morfologia próximos daqueles encontrados em biominerais.

A parafina e o polietileno foram escolhidos por serem de natureza química totalmente diferente da membrana de ovo, que reconhecidamente é um bom suporte para deposição de carbonato de cálcio. Além de terem natureza química totalmente diferente, a parafina e o polietileno podem ser moldáveis e também pode-se alterar a natureza química de sua superfície por dissolução compostos químicos (p. ex.: tensoativos).

No caso da associação cristal/matéria orgânica, a literatura[15] mostra que biominerais são constituídos de agregados policristalinos onde o material orgânico (proteína) exerce a função de agregador dos microcristais.

Como já foi mencionado, há um crescente interesse em se obter materiais análogos aos biominerais, levando-se em conta o seu potencial de aplicabilidade na obtenção de materiais sintéticos com propriedades físicas e mecânicas também análogas.

“Que o homem contemple a Natureza inteira em sua elevada e plena majestade, que ele afaste a vista dos objetos baixos que o cercam. Que ele veja essa brilhante luz como uma lâmpada eterna para iluminar todo o Universo, de modo que a Terra lhe pareça um ponto do vasto trajeto que este astro descreve, e que se espante com o fato de que esse vasto trajeto não é mais que uma ponta muito delicada comparada com o trajeto que os astros que giram no céu abraçam. E, se a nossa vista se detém aí, que a imaginação a substitua; ela se cansará mais de conceber do que a Natureza de oferecer. Todo esse mundo visível não é mais do que um traço imperceptível no amplo seio da natureza. Nenhuma idéia dela se aproxima. Em vão tentamos ampliar nossas concepções para além dos espaços imaginários, e não criamos mais do que átomos em troca da realidade das coisas. É uma esfera cujo centro está em toda a parte e a circunferência em parte alguma. [...] Que o homem, voltando-se para si mesmo, considere o que ele é em comparação com o que é; que ele se veja como desgarrado nesse canto desviado da Natureza, e que dessa pequena cela onde se encontra alojado, que entendo como o Universo, ele aprenda a estimar a Terra, os reinos, as cidades e ele mesmo pelo seu justo valor. Que é o homem no infinito? ...”

Blaise Pascal – Penseés.

2. Experimental

2.1. Material e equipamentos

Reagentes

- Ágar bacteriológico - Biobrás;
- Carbonato de cálcio anidro, grau analítico - Farmácia Brasileira;
- Carbonato de sódio anidro, grau analítico - Grupo Química e Art Lab;
- Cloreto de cálcio anidro, grau analítico - Vetec;
- Cloreto de Magnésio, grau analítico - Vetec;
- CO₂ sólido (gelo seco) - Liquid Carbonic;
- Colágeno comercial - Otker;
- Ovo de galinha *in natura* - comercial;
- Polietileno de baixa densidade, d=0,915 g/L - Aldrich;
- Parafina, p.f. = 65-68 °C - Aldrich.

Equipamentos básicos

- Bomba dosadora peristáltica Milan;
- Difratômetro Philips modelo PW-1710;
- Microscópio óptico e acessórios para registro fotográfico Olympus CBA-K;
- Acessórios do microscópio: câmara fotográfica Olympus modelo PM-6 e exposímetro Olympus modelo EMM-7
- Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 840A e acessórios de preparação de amostras;
- Vidraria comum (béqueres, erlenmeyers, placas de petri, etc...);
- Vidraria especial (reatores).
- Banho termostático com unidade de aquecimento Marconi.

2.2. Métodos

2.2.1. Cristalização de CaCO_3 em solução aquosa

Preparação de solução supersaturada de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$

Em uma cuba cilíndrica de 2,5 L foi adaptado um funil com placa de vidro sinterizado (gooch) em cuja haste adaptou-se uma saída lateral, com torneiras em ambas as saídas (figura 05). Mantendo a torneira inferior fechada, foi injetado CO_2 pela torneira lateral, por meio de uma mangueira de látex conectado a um kitassato de 1 L contendo gelo seco; em seguida, foi adicionada à cuba água destilada e carbonato de cálcio em excesso.(ca. 0,7 g/L). Esta sequência foi elaborada e seguida cuidadosamente após ter sido notado que, na sequência inversa (adição de água e posterior injeção de CO_2), o gás encontrava certa dificuldade em empurrar o líquido presente no interior da placa sinterizada e vencer a coluna de água acima dela

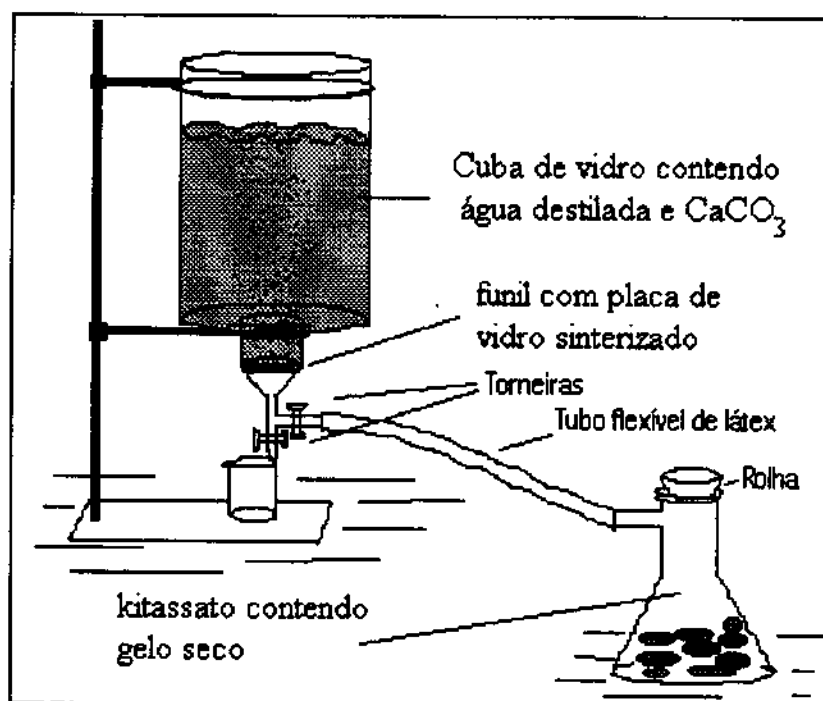


Figura 05: Montagem para produção de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ a partir de CaCO_3 e CO_2 .

Cristalização de CaCO_3 em solução

Após uma hora de fluxo de CO_2 interrompeu-se o borbulhamento e, através da torneira inferior coletou-se a solução supersaturada em béqueres de 500 mL, em porções de aproximadamente 400 mL, os quais eram mantidos em repouso por sete dias, durante os quais os cristais se formavam tanto na superfície como nas paredes dos béqueres. Após este intervalo, coletavam-se os cristais formados na superfície (figura 06) com o auxílio de uma lâmina de vidro própria para microscopia óptica. A lâmina com o material coletado, depois de seco ao ar, era então analisada através de microscopia óptica.

Para os experimentos na qual foi adicionado MgCl_2 , o procedimento foi o mesmo descrito acima, onde 1,00 g de MgCl_2 foi dissolvido à solução inicial de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$. Todos os experimentos desta secção foram realizados em triplicata,

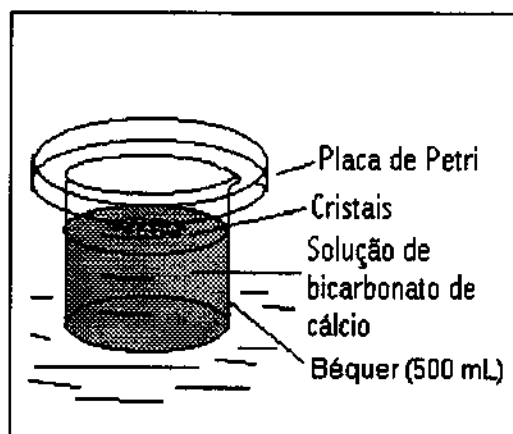


Figura 06: Disposição da montagem para cristalização de CaCO_3 .

O método anteriormente descrito é uma adaptação de outro descrito em literatura[7], para se obter uma solução supersaturada de CaCO_3 . No método acima apresentado, o tempo de injeção de CO_2 foi reduzido de 24 hs para 1 h. A adaptação foi realizada da seguinte forma: dentro da cuba reacional, em cuja parte inferior estava passando CO_2 gasoso, foram adicionados 2 L de água destilada. Posteriormente, em pequenas porções ($\sim 0,2$ g), adicionava-se CaCO_3 até completa dissolução, sendo anotado o tempo até o momento em que não se observou dissolução da última alíquota (3 hs).

O teste foi repetido nas mesmas condições, adicionando-se uma quantidade de CaCO_3 próxima à quantidade provável de saturação (1,93 g para 2 L de água destilada), anotando-se o tempo gasto para a dissolução. A reação foi levada a termo depois de 3 h, sendo ainda observada pequena quantidade de CaCO_3 não solubilizado (corpo de fundo). Novamente foi repetido o processo para 1,50 g de carbonato, sendo que após 1,5 h foi observada apenas ligeira turvação da solução. Repetiu-se o processo para a mesma quantidade (1,50 g) e, após 1 h, obteve-se o mesmo resultado. Desta forma, fixou-se o tempo em 1 h e a quantidade de 1,50 g de CaCO_3 /2 L de água destilada.

2.2.2. Cristalização de CaCO_3 em suportes sólidos

Com a finalidade de observar adesão e crescimento de cristais de CaCO_3 em suportes sólidos foram utilizados parafina, polietileno e membrana interna de casca de ovo de galinha.

Em todos os experimentos acima descritos utilizou-se alíquotas de 400 mL de solução supersaturada de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ em béqueres de 500 mL, em triplicata e o tempo utilizado para a cristalização foi de 7 dias.

Cristalização em Parafina

Para se cristalizar CaCO_3 em parafina, primeiramente aqueceu-se parafina sobre água destilada em um béquer de 500 mL, para se obter uma placa delgada e aproximadamente do mesmo diâmetro do béquer no qual ocorreria a cristalização. Após a fusão da parafina, desligou-se o aquecimento e deixou-se o mesmo esfriar. O suporte sólido foi então colocado sobre a solução de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ (figura 07); após 7 dias foi retirado e analisado em microscópio óptico.

Cristalização em Polietileno

Na cristalização em polietileno utilizou-se polietileno granular que, após ser lavado uma vez com uma solução de HCl (~ 2 M) e enxaguado por três vezes com água destilada, era simplesmente depositado sobre a solução supersaturada de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ (por ser menos denso que a água, o polietileno permanecia na superfície), procedendo-se de modo análogo ao descrito para a parafina.

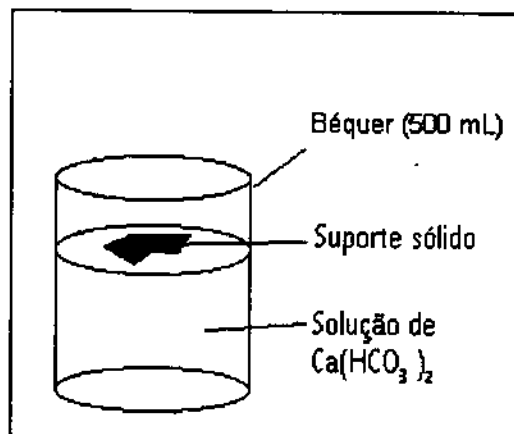


Figura 07: Montagem para cristalização de CaCO_3 em suporte sólido.

Cristalização em membrana de ovo

A membrana de casca de ovo (figura 08) foi obtida a partir de ovos comerciais de galinha *in natura*. A extração mecânica da membrana foi realizada com o auxílio de uma pinça metálica; após retirada a membrana, esta foi lavada com água destilada, cortada ainda úmida em duas partes, sendo uma colocada cuidadosamente sobre a superfície da solução supersaturada de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$. Paralelamente, a outra parte da amostra da mesma membrana foi depositada sobre uma lâmina de vidro, apropriada para microscopia óptica e, após ter sido seca ao ar, foi observada em microscópio óptico para se certificar de que a mesma não possuía cristais aderidos provenientes da casca de ovo.

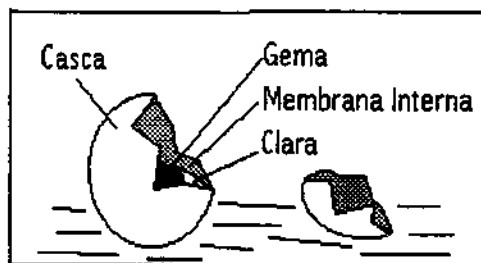


Figura 08: Estrutura de um ovo.

Microscopia óptica

As amostras obtidas por cristalização em solução foram recolhidas em lâminas de vidro para microscopia óptica, secas ao ar e levadas ao microscópio para observação e aquisição de fotos.

Procedimento básico de aquisição de fotos: Com a câmara e o exposímetro (calibrado previamente) já acoplados ao microscópio, observava-se a amostra; através do exposímetro era avaliado o tempo de exposição do filme fotográfico à imagem, dependendo da intensidade luminosa total da amostra. O tempo de exposição da película fotográfica era controlado manualmente mediante a utilização de uma extensão flexível acoplada ao botão do obturador da câmara fotográfica. O filme fotográfico utilizado foi do tipo comercial (Kodak) colorido - ASA100 e a revelação seguiu métodos usuais praticados comercialmente.

2.2.3. Cristalização de CaCO_3 em gel.

Os primeiros ensaios foram realizados em tubos de ensaio, como é descrito usualmente na literatura, obtendo-se uma interface entre a solução (de eletrólito externo) e a gelatina (contendo o eletrólito interno) composta de cristais de CaCO_3 . A partir destes resultados preliminares, foi idealizado um sistema mais dinâmico, simulando uma renovação contínua de reagente durante a cristalização, que se converteu na montagem descrita a seguir.

Síntese de anéis de Liesegang

Para os experimentos envolvendo anéis de Liesegang foi idealizado um reator que simulasse condições de troca dinâmica de reagentes, tal como em sistemas vivos. Este reator consiste em um béquer externo de 500 mL; um tubo de vidro de 4 cm de diâmetro interno e fechado em uma das extremidades; próximo à extremidade fechada foram soldados dois tubos de vidro de 0,2 cm de diâmetro interno em posições diametralmente opostas e com um desnível de aproximadamente 0,5 cm entre eles (figura 09); a solução de eletrólito externo entra pelo tubo inferior e sai pelo tubo superior com a ajuda de uma bomba peristáltica acoplada à juzante (figura 10).

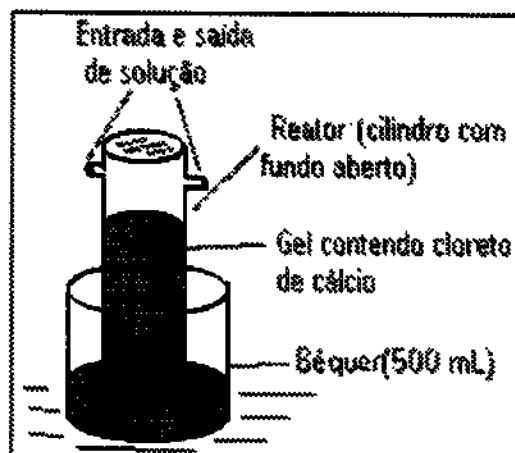


Figura 09: Montagem do reator.

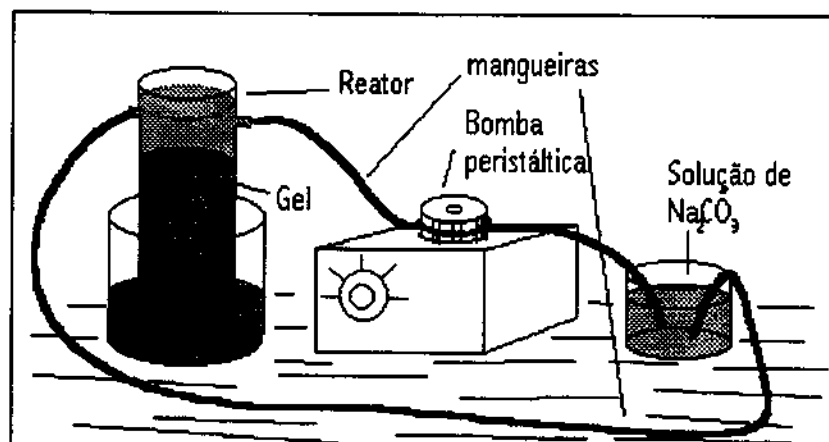


Figura 10: Montagem completa para cristalização em gel de ágar.

O procedimento de preparação dos anéis de Liesegang foi concebido a partir de tentativa e erro e os valores experimentais foram escolhidos arbitrariamente. Basicamente como se segue: no béquer de 500 mL contendo 400 mL de água destilada, foram dissolvidos 10 g de CaCl_2 , e 2 g de ágar bacteriológico, nesta sequência e sob agitação magnética. A mistura formada foi aquecida até atingir a temperatura de ebulição, mantida por aproximadamente 1 minuto sob fervura. Ao béquer, contendo a solução ainda quente, foi então colocado o tubo de vidro que corresponde à parte interna do reator, já com as mangueiras acopladas à entrada e saída da solução e, por meio de aspiração pelas mangueiras, elevou-se o nível da mistura no interior do reator até alguns milímetros abaixo da entrada superior do reator; as duas extremidades livres das mangueiras foram unidas entre si com o auxílio de um conector, para impedir o retorno da mistura ao seu nível original. A mistura, ainda líquida, foi mantida em repouso para solidificar por aproximadamente 12 horas.

À parte, preparou-se uma solução de Na_2CO_3 a qual, após a solidificação da gelatina, se fez passar pela parte superior do reator por meio de uma bomba peristáltica, cujo fluxo é de aproximadamente 200 mL/h, como ilustrado na figura 07. Deve se frisar que existe uma pequena diferença de altura entre a entrada e saída superiores, estando a saída em posição ligeiramente superior em relação à entrada do reator. Após 3 dias, o gel foi retirado do reator por meio de sopro pelas saídas superiores e a parte contendo o material precipitado foi separada por corte, depositada sobre placa de petri e colocada em geladeira para secar (liofilização) durante uma semana ou mais, dependendo da espessura da amostra, sendo

posteriormente caracterizada via difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

Também foram realizados alguns experimentos a temperatura controlada (30-34 °C), nos quais o reator foi parcialmente imerso em um banho termostático de água, como ilustrado na figura 11.

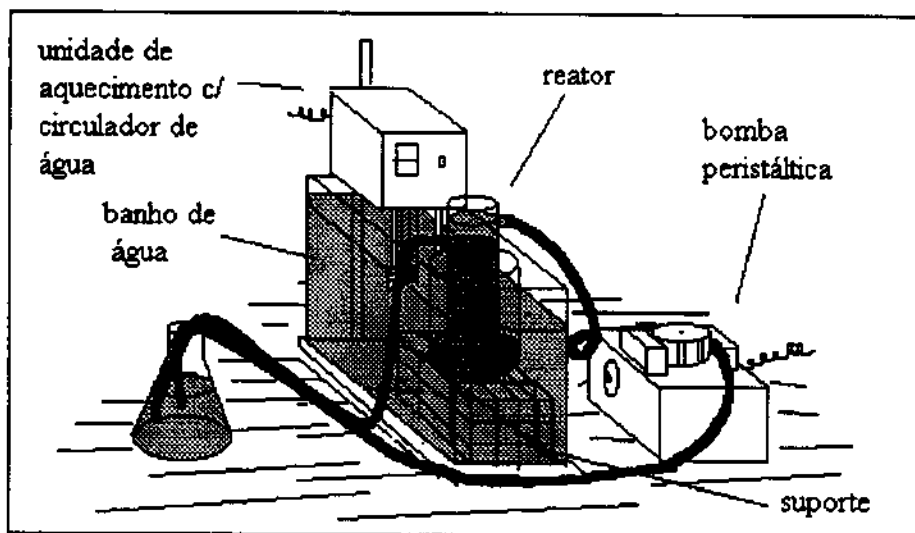


Figura 11: desenho ilustrativo do reator imerso em banho termostático.

Este banho consiste em uma cuba de vidro com capacidade de aproximadamente 20 L, uma armação de arame que serve de apoio ao reator e uma unidade de aquecimento com sistema de circulação de água acoplado. Utilizou-se uma cuba de proporções relativamente grandes com o intuito de assegurar uma boa inércia térmica, através da quantidade de água a ser aquecida/resfriada. A parte superior do reator foi coberta com placas de isolante térmico (não ilustrado na figura, para melhor entendimento da montagem), para assegurar homogeneidade de temperatura.

Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras obtidas pelo método de formação de anéis de Liesegang apresentaram cristais pequenos demais para serem observados por microscopia óptica, sendo usada

microscopia eletrônica de varredura, onde as mesmas foram fraturadas por meio de flexão mecânica e colocadas em suportes apropriados para microscopia eletrônica de varredura e recobertas por filme de ouro (cerca de 4 nm) de espessura, pelo processo de "sputtering" ("Sputer" Edward S150B); o suporte utilizado era do tipo grande, com 2,5 cm de diâmetro. O microscópio (JEOL JSM 840A) operou a 25 kV em condições de vácuo de 0,1 a 0,01 Pa. A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP e as micrografias foram obtidas por Flávia M. Cassiola.

Difração de raios X

Para a análise de difração de raios X foi usado o método de pó, onde as amostras, depois de secas, foram pulverizadas manualmente em almofariz de ágata, fixadas em uma lâmina de vidro (dimensões: 0,2 x 1,5 x 5,0 cm) com graxa de silicone e levadas a um difratômetro Philips, baseado no modelo PW-1710, utilizando radiação de um tubo de cobre (linha $k\alpha$, a $\lambda = 1,54060$ nm), com tensão de 40 kV e corrente de 30 mA; o intervalo de aquisição foi de 2 segundos por passo. O equipamento possuía monocromador acoplado ao feixe de radiação. As análises foram realizadas no Laboratório de Difração de Raios-X do Instituto de Física da Unicamp.

“Mas, para lhe apresentar outro prodígio igualmente espantoso, que ele procure no que conhece, as coisas mais delicadas. Que um minúsculo inseto lhe ofereça na pequenez de seu corpo, partes incomparavelmente menores, pernas com juntas, veias nessas pernas, sangue nessas veias, humores nesse sangue, gotas nesses humores, vapores nessas gotas. Que, dividindo ainda mais essas coisas, ele gaste seus esforços em suas concepções e que o objeto final a que ele chegar, seja o de nosso discurso; ele pensará, talvez, que se trata da menor partícula da Natureza. Eu desejo fazê-lo ver ali dentro, um novo abismo. Desejo que veja não só o Universo visível, mas a imensidade que se possa conceber sobre a Natureza, dentro dos limites desse resumido átomo. Que ele veja um infinito Universo, cada um com seu firmamento, seus planetas, sua Terra, na mesma proporção do mundo visível; nessa Terra, animais e os pequeninos insetos nos quais encontrará o que os primeiros lhe revelaram; e encontrando nesses outros a mesma coisa sem fim e sem repouso, que ele se perca nessas maravilhas tão espantosas por sua pequenez quanto as outras por sua extensão. Pois quem não se admirará de que o nosso corpo, que não era perceptível no Universo, imperceptível no seio do todo, seja agora um colosso, um mundo, ou um todo com relação ao nada onde não se pode chegar? ...”

Blaise Pascal – “Penseés”.

3. Resultados

Esta linha de pesquisa foi iniciada com este trabalho. Inicialmente, foi necessário adquirir familiaridade com o fenômeno de cristalização de CaCO_3 . Para tanto, foram realizados ensaios exploratórios, consistindo na cristalização livre, para depois realizar os experimentos de cristalização em suportes.

3.1. Cristalização em solução

Foram realizados ensaios visando a produção de cristais de calcita em solução de bicarbonato de cálcio, com o objetivo de se obter familiaridade nos processos de cristalização. Foram realizados 5 ensaios, obtendo-se cristais de calcita semelhantes quando observados por microscopia óptica. A figura 12 é uma foto típica de um agrupamento destes cristais. Os cristais apresentam-se bem formados, com tamanho uniforme, arestas e planos bem definidos na geometria romboédrica. Na maior parte das vezes, estes cristais se apresentaram aglomerados de forma aleatória.

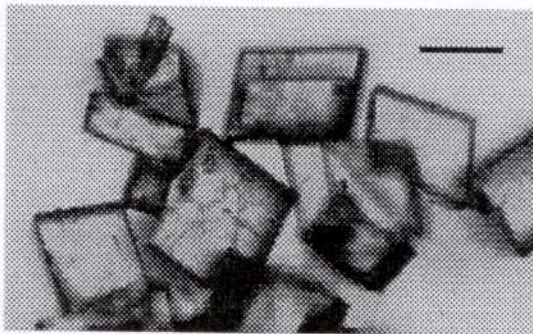


Figura 12: Micrografia óptica de cristais de calcita obtidos por cristalização em solução, a barra de aumento corresponde a 10 μm .

Os cristais foram também caracterizados por difração de raios X, para o qual juntou-se o material obtido em 4 experimentos, pois as amostras isoladas não atingiam a quantidade mínima para análise. O difratograma é apresentado na figura 13a. Para a identificação foi utilizado um difratograma padrão de calcita (ficha JCPDS No 5-586), que é apresentado na figura 16b, onde é apenas ilustrado a posição das raiais, sem a altura relativa dos picos. Os padrões apresentados neste trabalho são originários de uma biblioteca informatizada JCPDS - Joint Committee on Powder Diffraction Standart[40], obtendo-se boa concordância entre eles. Os picos a maiores ângulos de difração foram os que apresentaram menor concordância.

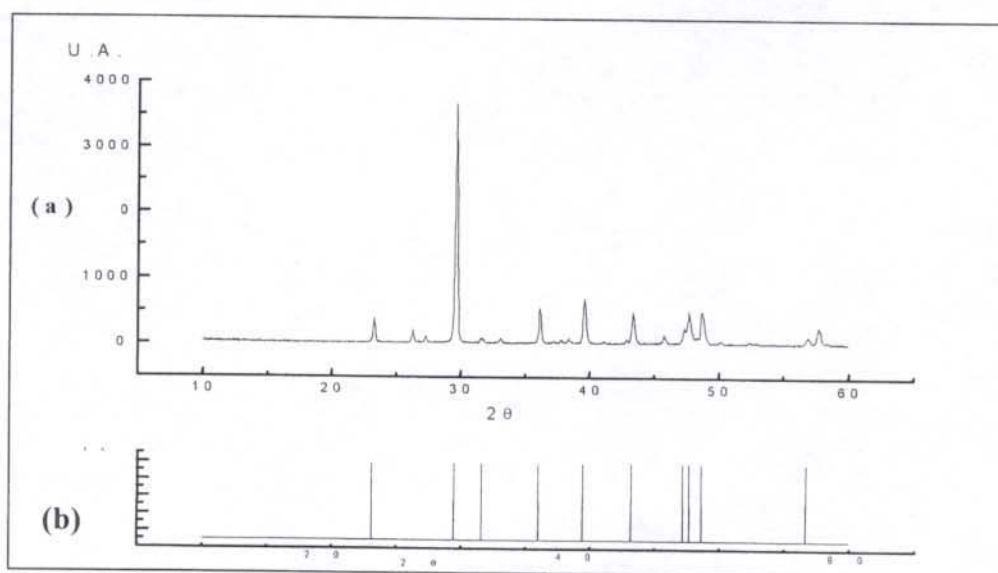


Figura 13: Difratograma de raios X dos cristais obtidos em solução de bicarbonato de cálcio (a) e padrão de difração para a calcita (b).

A seguir, foi adicionado 1,00 g de MgCl_2 na solução de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ que, de acordo com a literatura, modifica o hábito cristalino para a forma aragonita. Foram realizados cerca

de 12 ensaios. Obteve-se cristais com tamanho, arestas e superfícies bem definidas, em forma de pontas de flechas (isolados ou agrupados), como apresentado na figura 14, que de acordo com a literatura, são cristais de calcita denominados, devido ao seu formato, “dentes de cão”[43].

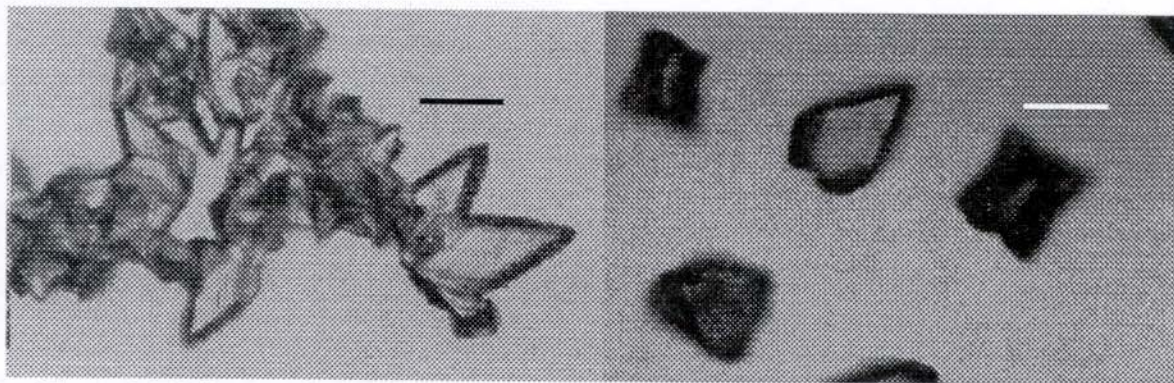


Figura 14: Micrografia óptica de cristais de CaCO_3 obtidos por cristalização a partir de solução de bicarbonato de cálcio. A barra de aumentos corresponde a 10 μm .

Em alguns experimentos foi observada a proliferação de microorganismos, ocasionando a formação de cristais com arestas arredondadas e planos mal definidos, como mostrado na figura 15. Várias tentativas foram realizadas com a finalidade de eliminar esta contaminação, sendo eficiente a adição de 3 gotas de solução de hipoclorito de sódio a 5% m/v em 400 mL de solução de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$. O hipoclorito de sódio tem o inconveniente de reagir com outras substâncias orgânicas de interesse que estejam presentes na solução, apesar de não afetar os experimentos com a adição de outros tipos de eletrólitos.

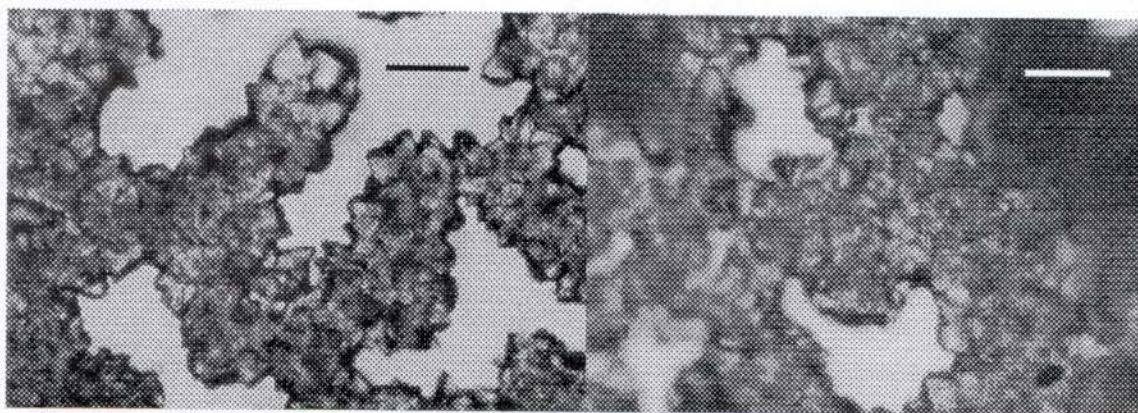


Figura 15: Micrografias ópticas de cristais obtidos pela adição de MgCl_2 à solução de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, na presença de microorganismos. A barra de aumentos corresponde a 10 μm .

Em um experimento recente, no qual se objetivou a replicação dos experimentos relatados nesta seção, observou-se o aparecimento de aglomerados aciculares ao se manter a solução contendo MgCl_2 por duas semanas em repouso. Anteriormente constatou-se o aparecimento destas estruturas, porém este fato foi atribuído como sendo devido à proliferação de microorganismos. No caso da replicata, foi observado na primeira semana apenas os cristais na forma de “dentes de cão”, já no final da segunda semana, observou-se as estruturas aciculares junto com os primeiros. Como a solução foi submetida a tratamento com hipoclorito de sódio e não havia sinais de microorganismos, coletou-se uma amostra para análise por difração de raios X. O resultado é mostrado na figura 16 que, quando comparado com difratogramas padrão de aragonita e calcita (fichas JCPDS No 5-453 e No 5-586, respectivamente), comprova a existência de ambas as formas.

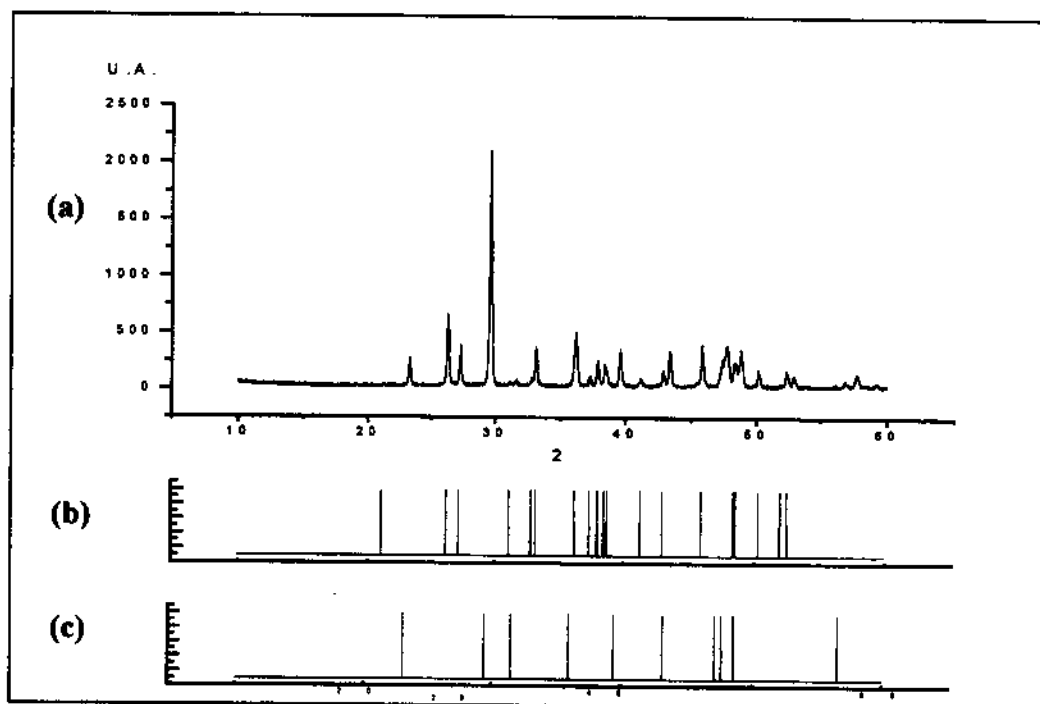


Figura 16: Difratograma de raios X dos cristais obtidos em solução de bicarbonato de cálcio e 1,15 g de MgCl_2 (a); padrões de difração de raios X para a aragonita (b) e calcita (c).

A figura 17 exemplifica a forma dos cristais de aragonita obtidos experimentalmente.

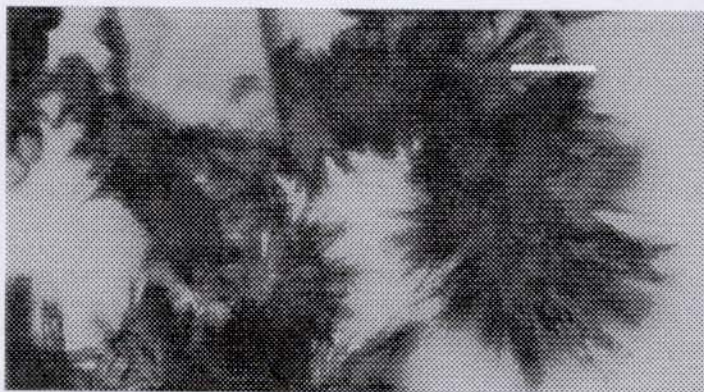


Figura 17: Cristais aciculares de aragonita obtidos pela adição de MgCl_2 à solução de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$. A barra de aumentos corresponde a $10\ \mu\text{m}$.

3.2. Cristalização em suportes sólidos

Como etapa subsequente aos experimentos de cristalização em solução, foi realizada a cristalização de CaCO_3 em suportes sólidos, desde que a literatura mais recente indica esta como possível via para o estudo de biomineralização *in vitro*. Foram escolhidos a membrana de casca de ovo de galinha, polietileno e parafina como suportes sólidos.

A membrana de casca de ovo foi escolhida por ser um material que naturalmente já é um suporte para biomineralização, visto que a deposição de CaCO_3 ocorre no oviduto das aves, depois que o ovo propriamente dito se formou. Quanto à parafina e polietileno, estes foram escolhidos por terem naturezas químicas totalmente diferentes da membrana de ovo e por serem facilmente convertidos em lâminas delgadas, servindo desta forma como um referencial comparativo do comportamento de cristalização em relação ao outro suporte.

Os experimentos visando o crescimento de cristais em membrana de ovo mostraram resultados positivos, com cristais aderidos em todo o perímetro da porção de membrana selecionada para o experimento e também na superfície em contato com a solução como ilustrados nas figuras 18a e 18b. Na figura 18a há indicação de continuidade de deposição de cristais de CaCO_3 para além da superfície imediata da membrana. Observou-se também uniformidade na deposição, independente da região do suporte

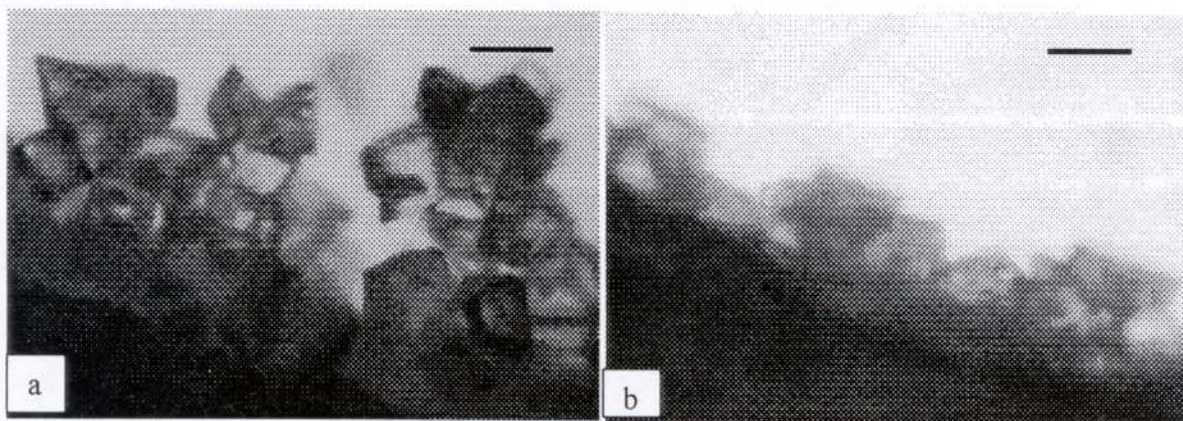


Figura 18: Micrografia óptica de cristais de CaCO_3 aderidos à superfície de membrana de ovo, obtidos por cristalização a partir de solução de bicarbonato de cálcio. A barra de aumentos corresponde a 10 μm .

No caso da parafina (figura 19) e do polietileno (figura 20), a cristalização sobre os suportes foi menos eficiente, não se obtendo continuidade na deposição, havendo apenas alguns cristais em agrupamentos ou isolados, distribuídos pela superfície dos suportes.

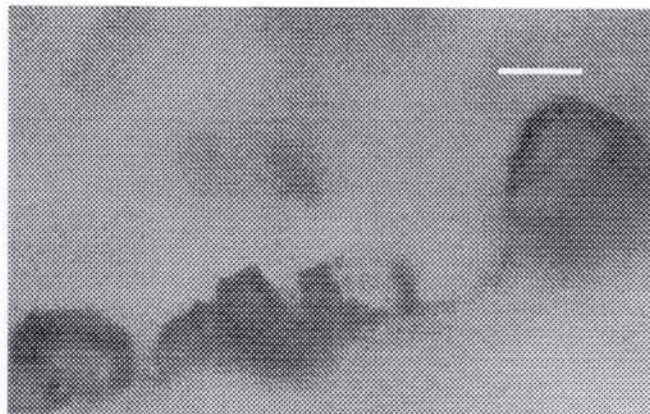


Figura 19: Micrografia óptica de cristais ancorados em parafina, obtidos a partir de solução de bicarbonato de cálcio. A barra de aumentos corresponde a 10 μm .

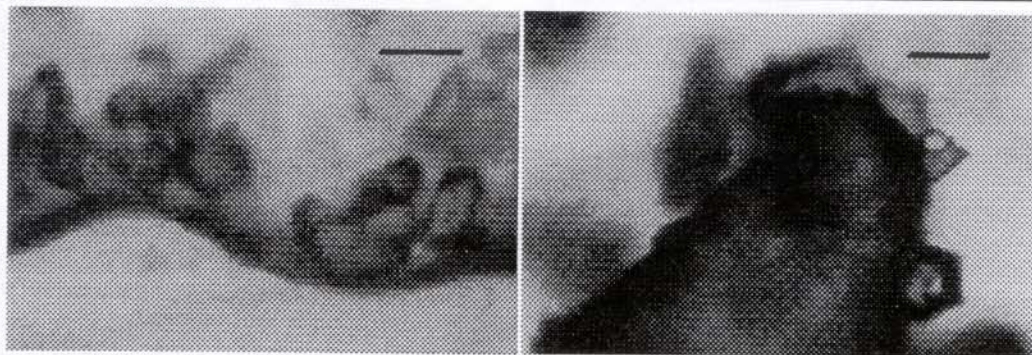


Figura 20: Micrografias ópticas de cristais ancorados em polietileno, obtidos a partir de solução de bicarbonato de cálcio. A barra de aumentos corresponde a 10 μm

Assim como no caso dos experimentos visando a obtenção de cristais de calcita, as soluções foram mantidas em repouso, recobertas com papel alumínio com estreitas perfurações para troca de gases por sete dias.

3.3. Cristalização em gel

Uma série de experimentos foi realizada, em número aproximado de 22, segundo o arranjo descrito na parte experimental. Em todos os casos verificou-se a formação de cristais, penetrando no gel alguns centímetros. Na maioria dos casos obteve-se anéis de Liesegang, que são descritos no próximo item. Quando não, a distribuição do material sólido é aparentemente uniforme ao longo do gel.

A Tabela I apresenta as condições de realização dos experimentos onde não se observou a formação de anéis. Novamente, adicionou-se MgCl_2 com o intuito de direcionar a formação de aragonita; em alguns experimentos foi adicionado à solução, em outros foi adicionado ao próprio gel onde aparentemente causou a precipitação de carbonato de magnésio na superfície do gel. Além disso, foram mudadas as concentrações de cloreto de cálcio e de carbonato de sódio.

Tabela I: Condições experimentais para cristalização sem a formação de anéis de Liesegang.

Designação do experimento	Na ₂ CO ₃ (g)	MgCl ₂ (g)	CaCl ₂ (g)	Observações
CGL-01	10,05	-	5,07	
CGL-02	10,00	-	5,00	
CGL-03	10,07	-	5,01	
CGL-04	12,00	-	10,21	
CGL-05	7,00	-	10,00	
CGL-06	5,00	-	10,10	
CGL-07	10,00	-	10,00	
CGL-08	10,12	-	5,09	
CGL-09	10,00	1,05	5,00	MgCl ₂ na solução
CGL-10	5,00	1,10	5,23	
CGL-11	10,19	1,12	5,10	MgCl ₂ no gel

Em todos os experimentos foram utilizados 10,00 g de CaCl₂ para 400 mL de gelatina preparada.

Anéis de Liesegang de carbonato de cálcio

Na maioria dos experimentos de cristalização em gel, foi observada a formação de anéis de Liesegang dentro do gel, em número de até 5, sendo normalmente 4. Este material é bastante interessante podendo ser reproduzido com alguma facilidade, embora nem em todos os casos. A Tabela II apresenta resultados.

Tabela II: Condições experimentais para a produção dos anéis de Liesegang.

Designação do experimento	Na ₂ CO ₃ (g)	MgCl ₂ (g)	Albumina (mL)	Observações
AL 02	5,00	-	9,0	
AL 03	5,00	-	5,0	
AL 04	5,00	0,70	5,0	
AL 05	5,00	0,70	5,0	
AL 06	5,00	1,00	-	
AL 07	25,00	1,87	-	20,00 g de NaHCO ₃
AL 08	25,00	1,87	-	anéis concêntricos
AL 09	25,00	1,87	-	
AL 11	5,00	0,85	-	MgCl ₂ no gel e 4g de ágar
AL 12	5,00	0,80	-	MgCl ₂ no gel
AL 13	5,00	0,85	-	MgCl ₂ no gel

Em todos os experimentos foram utilizados 10,00 g de CaCl₂ para 400 mL de gelatina preparada

O experimento denominado AL-04 foi inconclusivo porque os cristais formados ficavam apenas na superfície, o AL-07 foi uma tentativa de ver o efeito de tamponamento na formação dos cristais, contra o AL-08, sem bicarbonato. Porém, no experimento AL-08 foi observado a formação de anéis concêntricos em vez de lamelas, desta forma, no AL-09 tentou-se obter os mesmos anéis, sem sucesso.

Os resultados da seção anterior se referem a experimentos em que não se observou o aparecimento de anéis de Liesegang, que foram obtidos em todos os 13 primeiros experimentos. Nos experimentos subsequentes tal fenômeno deixou de ocorrer. Inicialmente se suspeitou da pureza de um dos reagentes (CaCl_2), o qual foi substituído por um frasco novo, apesar de ainda haver uma certa quantidade no primeiro frasco. Foi feito um teste com o reagente contido no primeiro frasco, usando quantidades idênticas à do experimento denominado AL-02, com resultado negativo. Posteriormente a este ensaio, suspeitou-se da estequiometria, pois o rótulo do primeiro frasco descrevia o reagente como " CaCl_2 anidro" e no segundo frasco como " CaCl_2 dihidratado", repetindo o experimento com a massa ajustada à estequiometria, não se obteve o resultado esperado. Foi realizado novo experimento com o que restava do CaCl_2 no primeiro frasco, com resultado igualmente negativo. Devido ao esvaziamento do primeiro frasco de CaCl_2 , foi realizado um teste em tubos de ensaio, onde se manteve a concentração original no gel correspondente ao experimento denominado AL-02 e variou-se a concentração da solução em torno da concentração usada no experimento original.

Por último, foi feito um teste de temperatura, por haver sido utilizado climatizadores na época em que o fenômeno deixou de ocorrer. Montou-se um banho de água termostaticado a 30°C , no qual se imergiu parcialmente o frasco contendo a solução de Na_2CO_3 e o béquer contendo o reator com gel; as concentrações utilizadas para todos reagentes foram as mesmas do experimento AL-02. Neste caso houve resultado positivo. O número de anéis obtidos foram em menor número e com fronteira menos definida. De todos estes experimentos, aparece como fator principal na reprodutibilidade da obtenção de anéis, o controle da temperatura. Mas a concentração dos reagentes também influencia.

Características dos sólidos obtidos

Os produtos obtidos pela cristalização em gelatina foram secos em geladeira por aproximadamente um mês, durante este período o volume total das amostras foi reduzido a aproximadamente 1/4 de seu volume. Os sólidos brancos obtidos, com espessura final entre 3 e 5 mm; mantinham parcialmente sua forma inicial, como ilustrado na figura 21. Apresentaram boa coesão entre as partículas e o ágar; permitindo manipulação e transporte sem dificuldades; porém baixa resistência à flexão, podendo serem fraturados com facilidade quando dobrados manualmente. A região de fratura apresentava bordas irregulares, obedecendo os planos dos anéis previamente formados.

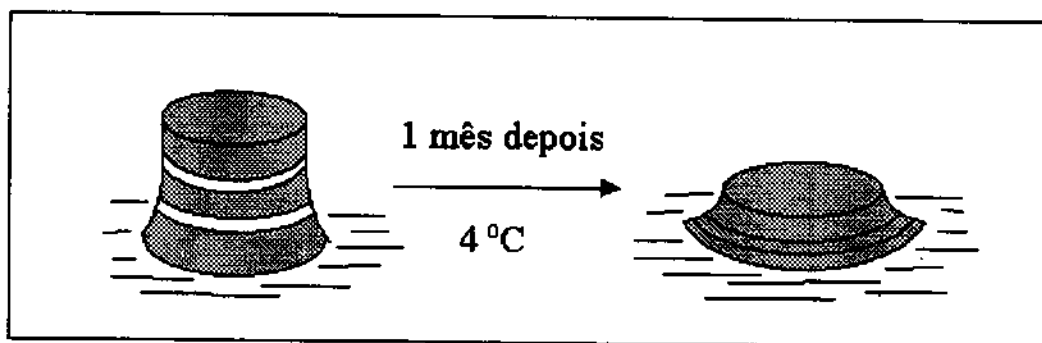


Figura 21: Desenho esquemático mostrando a evolução da secagem do produto formado por liofilização. Escala arbitrária

Em alguns experimentos, o sólido formado absorvia umidade ambiente quando mantido ao ar ambiente, deixando-o mecanicamente frágil. A possível explicação é que, nestes experimentos, o intervalo entre a interrupção da reação e a separação dos produtos e o restante da gelatina foi grande, quando em sua maioria o produto foi imediatamente separado do resto. Assim, durante este intervalo de tempo o CaCl_2 não-reagido presente na parte inferior da gelatina se difundiu pelo interior do produto e, sendo o CaCl_2 um sal higroscópico, absorvia a umidade ambiente para o interior do produto final.

A razão para se optar por este método de secagem das amostras é que ele pareceu mais brando, pois a temperaturas altas poderia degradar a parte orgânica, modificando a natureza do produto formado; e a secagem sob vácuo pareceu um tanto rápida, podendo não possibilitar a acomodação dos cristais em relação à matriz de ágar.

Difração de raios-X

Foram obtidos difratogramas de raios-X do material constituinte dos anéis formados, isto é, dos sólidos obtidos após a secagem, segundo descrito na parte experimental. Os difratogramas apresentados na figura 20 mostram que em todos os ensaios obteve-se cristais de calcita. Apesar da boa concordância geral entre o padrão (JCPDS No 5-586), e o experimental, alguns picos entre 45 e 60° não puderam ser atribuídas.

Um difratograma de produto obtido onde não se observou a formação de anéis de Liesegang é mostrado na figura 21. Não se notando diferenças significativas quando comparado com o padrão de calcita, como era de se esperar.

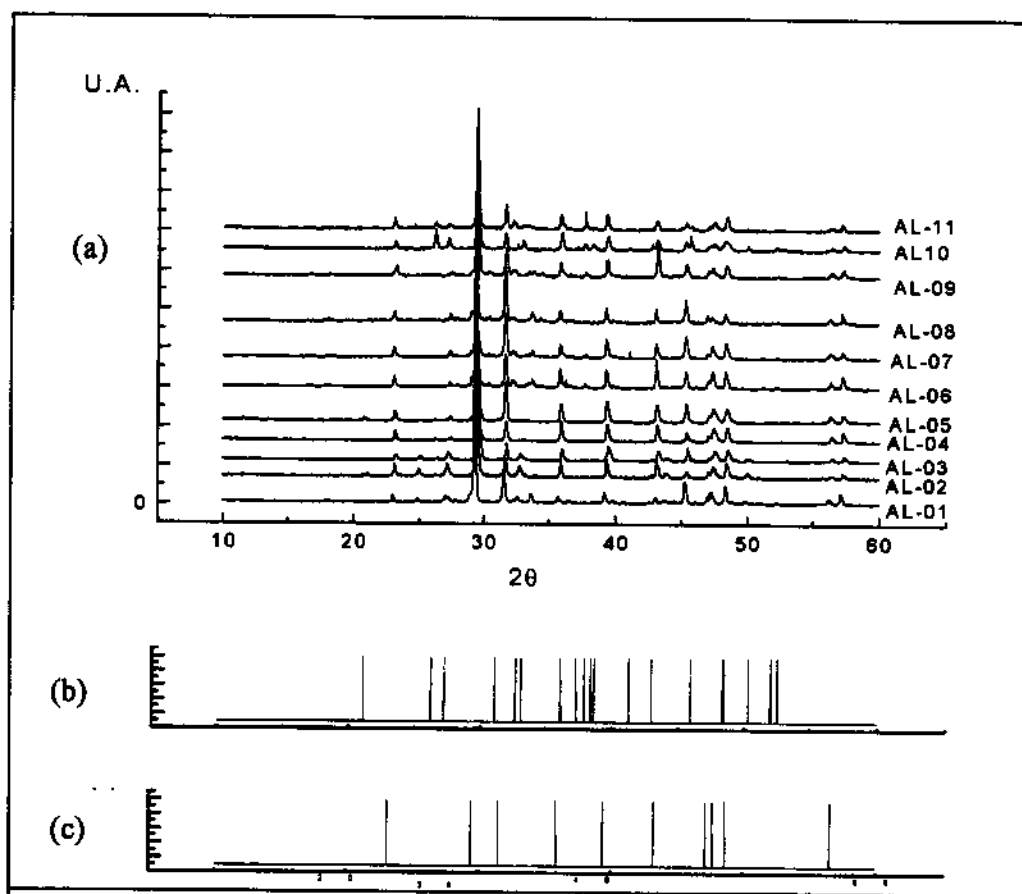


Figura 22: Difratogramas das amostras obtidas pela formação de anéis de Liesegang (a), padrão da aragonita (b) e padrão de calcita (c).

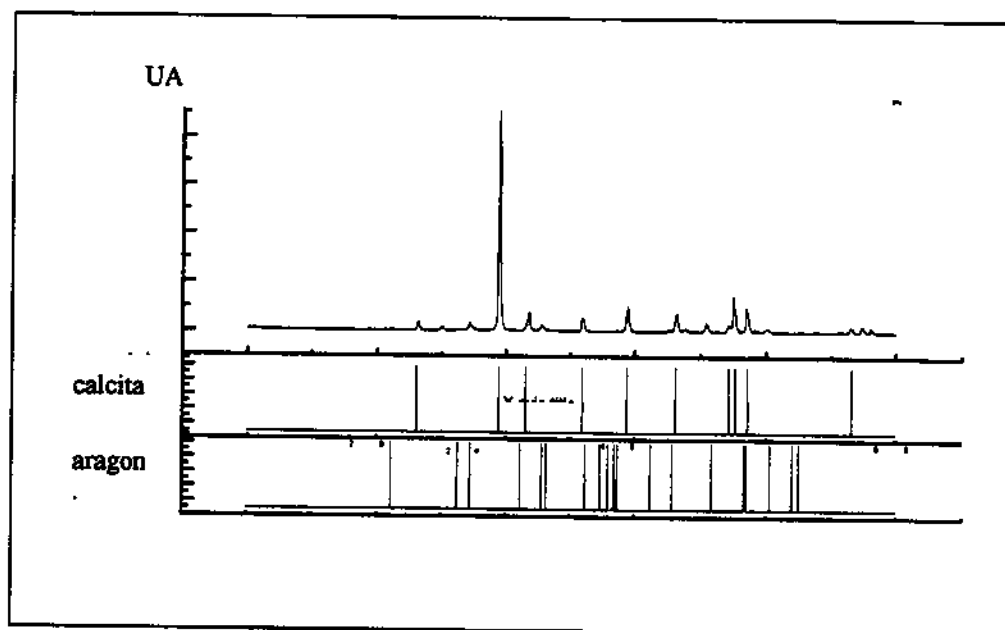


Figura 23: Difratoograma de produto obtido onde não se observou a formação de anéis de Liesegang

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Embora os resultados de difratometria mostrarem um único tipo cristalino, as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram diferentes hábitos cristalinos, dependendo das condições utilizadas.

A figura 24 mostra micrografias obtidas por MEV da amostra AL-01, sendo a panorâmica obtida da superfície do sólido e a ampliação de uma região interna, visível após fratura. Na primeira foto, observa-se um ambiente uniforme, com partículas aleatoriamente distribuídas, recobertos pelo ágar. A observação do interior da amostra, em um aumento maior, mostra apenas a presença de romboedros típicos de calcita, bem formados e de tamanho uniforme, com aproximadamente 15 μm de aresta e uma película de aparência plástica.

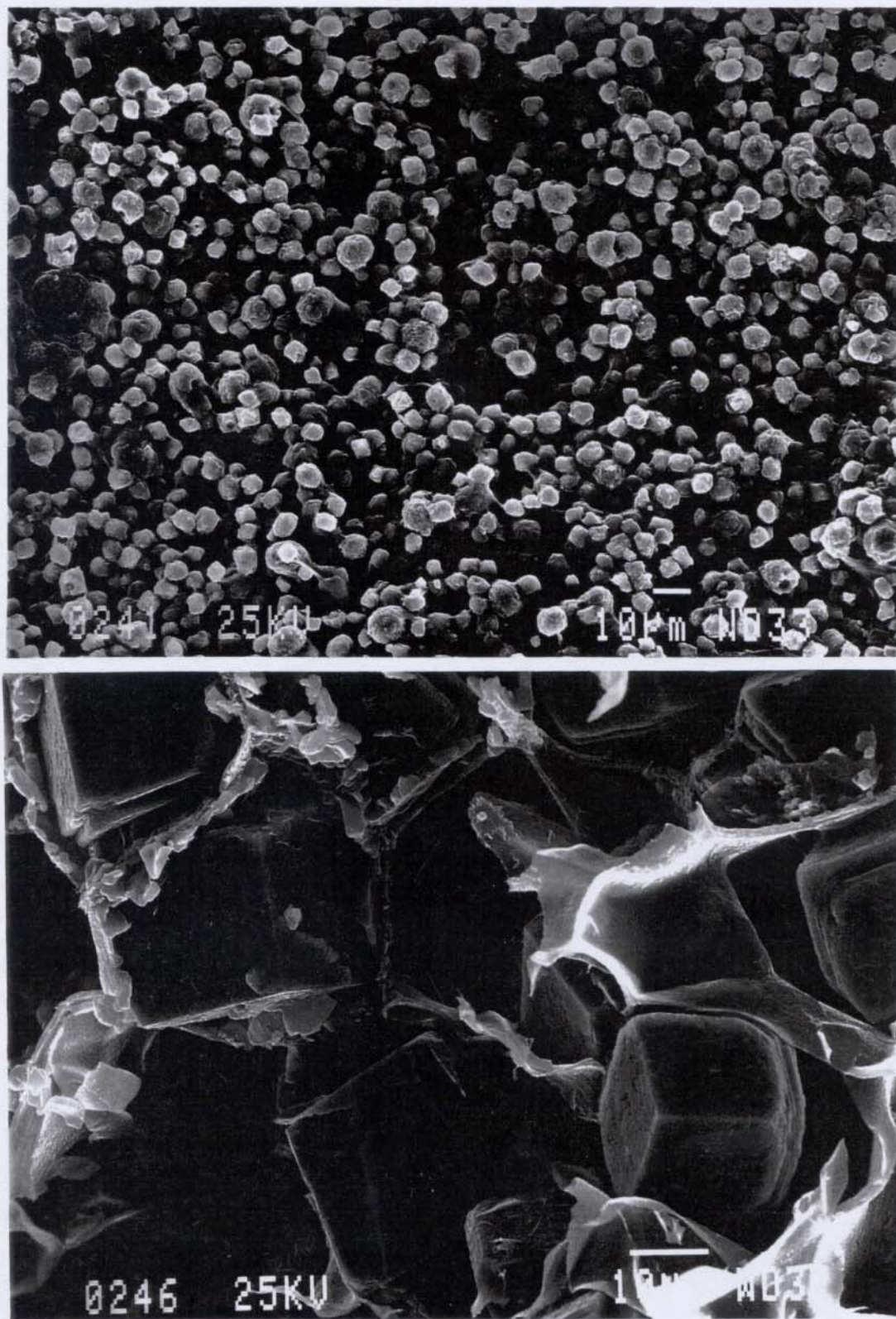


Figura 24: Micrografia eletrônica de varredura dos cristais obtidos após secagem da região dos anéis de Liesegang formados na amostra AL-01 (ágar, cloreto de cálcio e carbonato de sódio). Foto superior: região da superfície. Foto inferior: região interior (fratura). (FMC/LME-IF USP)

Por outro lado, a figura 25 apresenta cristais contidos no interior da amostra AL-05, mostrando a presença de dois tipos diferentes de estruturas, uma de forma romboédrica, de aproximadamente 20 μm de aresta e outra de forma lenticular, com aproximadamente 20 μm de comprimento, 15 μm de largura e 10 μm de espessura envolvidas pela mesma película de ágar.

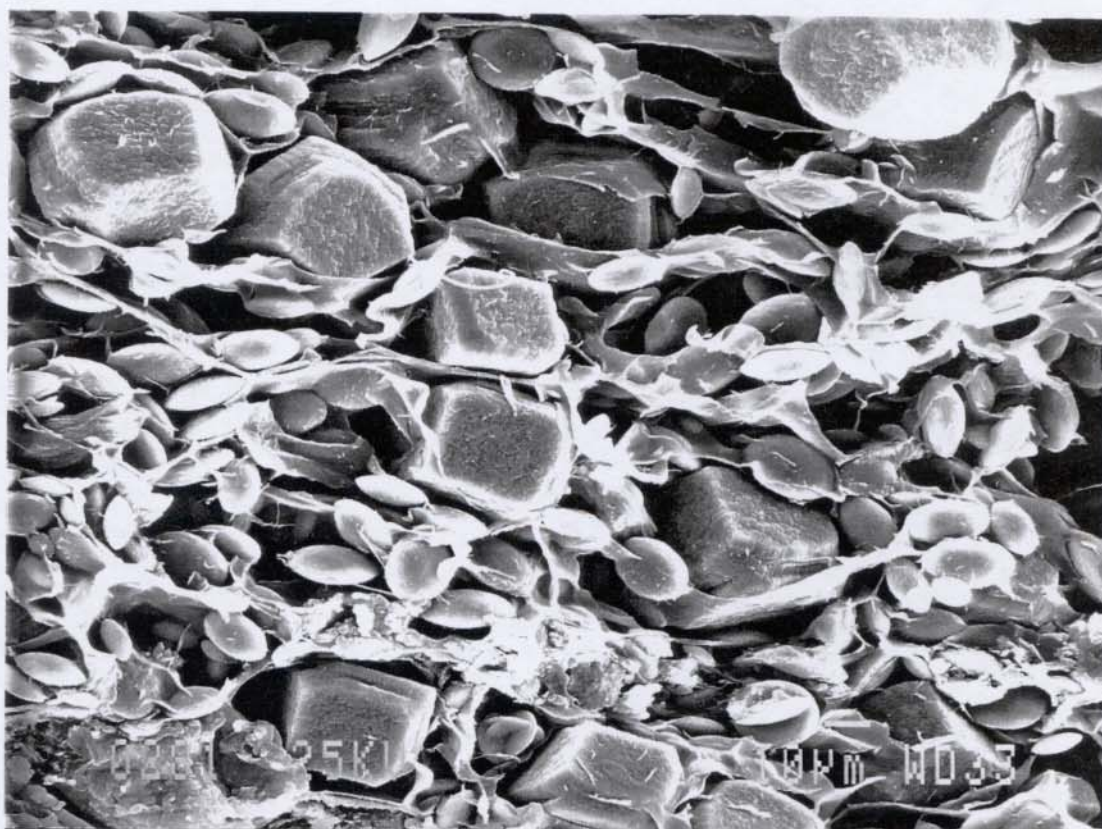


Figura 25: MEV da amostra AL-05, mostrando dois tipos de cristais, uma romboédrica e outra lenticular. (FMC/LME-IF USP)

Em alguns pontos isolados da amostra AL-03 foram observados estruturas esféricas aciculares, que foram observadas em maior número na amostra AL-13, como será apresentado mais adiante.

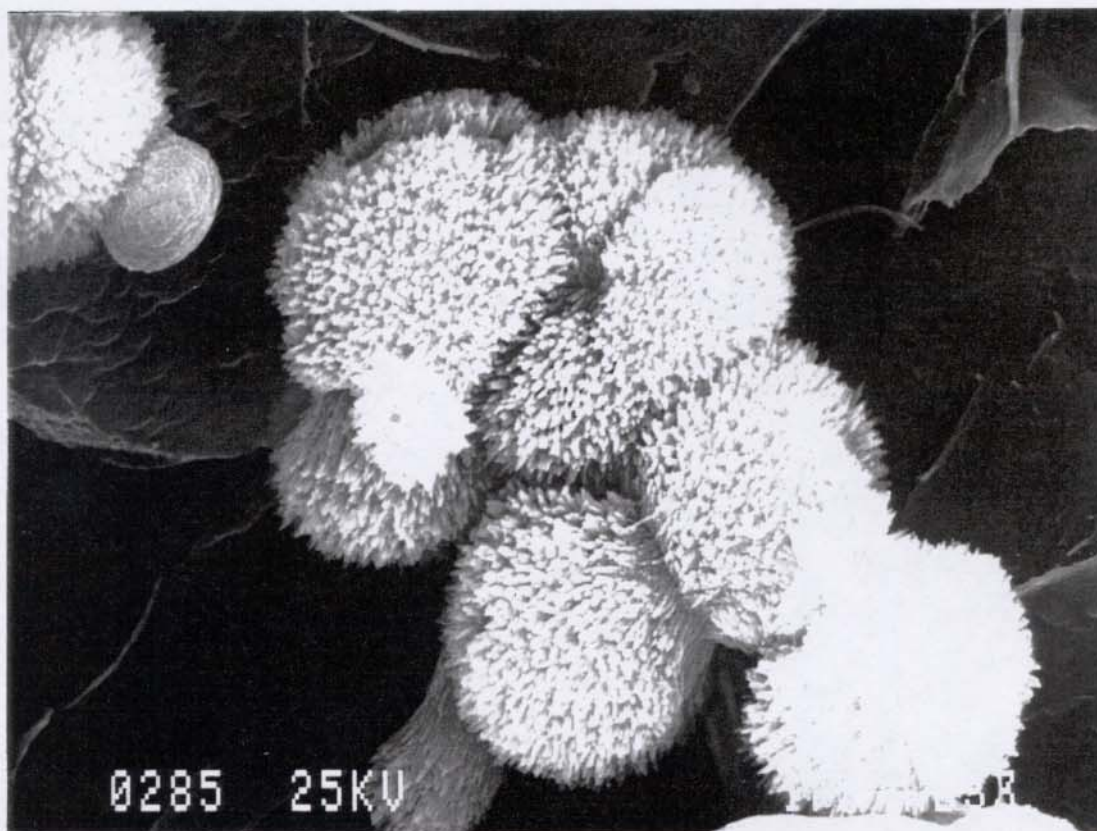


Figura 26: Estruturas esféricas aciculares ocasionalmente observados na amostra AL-03.
(FMC/LME-IF USP)

O mesmo resultado geral é apresentado nas fotografias da amostra AL-06, como ilustrado na figura 27. Na ampliação da estrutura lenticular, nota-se claramente que sua superfície é constituída de vários planos de crescimento, confirmando a sua cristalinidade.

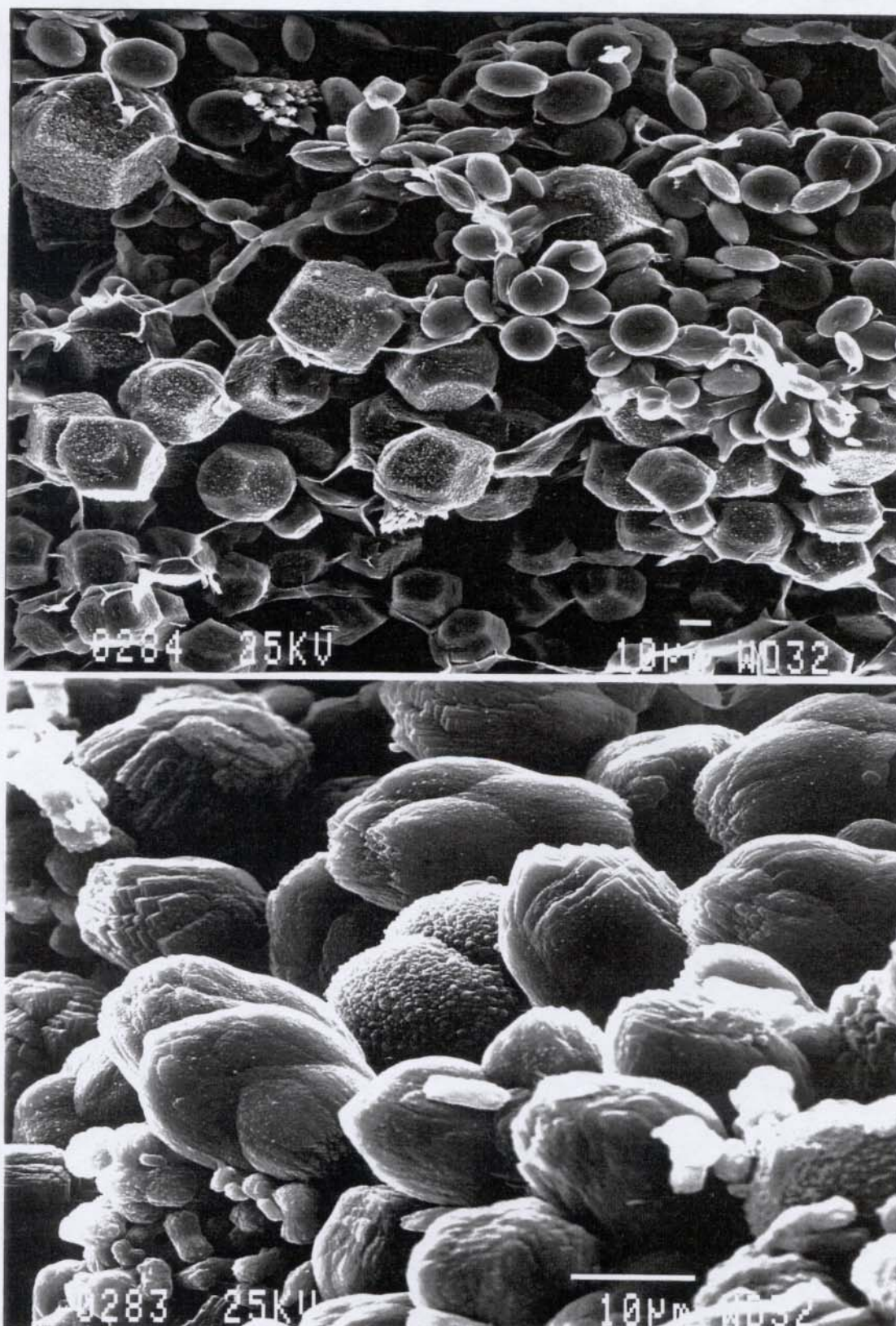


Figura 27: AL-06, mostrando dois tipos diferentes de estruturas cristalinas como a AL-05, abaixo: ampliação das lenticulas, mostrando a sua natureza cristalina. (FMC/LME-IF USP)

Os cristais das amostras a AL-07, e AL-08 apresentam-se majoritariamente na forma romboédrica e alguns na forma lenticular. Na amostra AL-08 foi observado um tipo diferente de estrutura, em pequena quantidade, como ilustrado na figura 28.

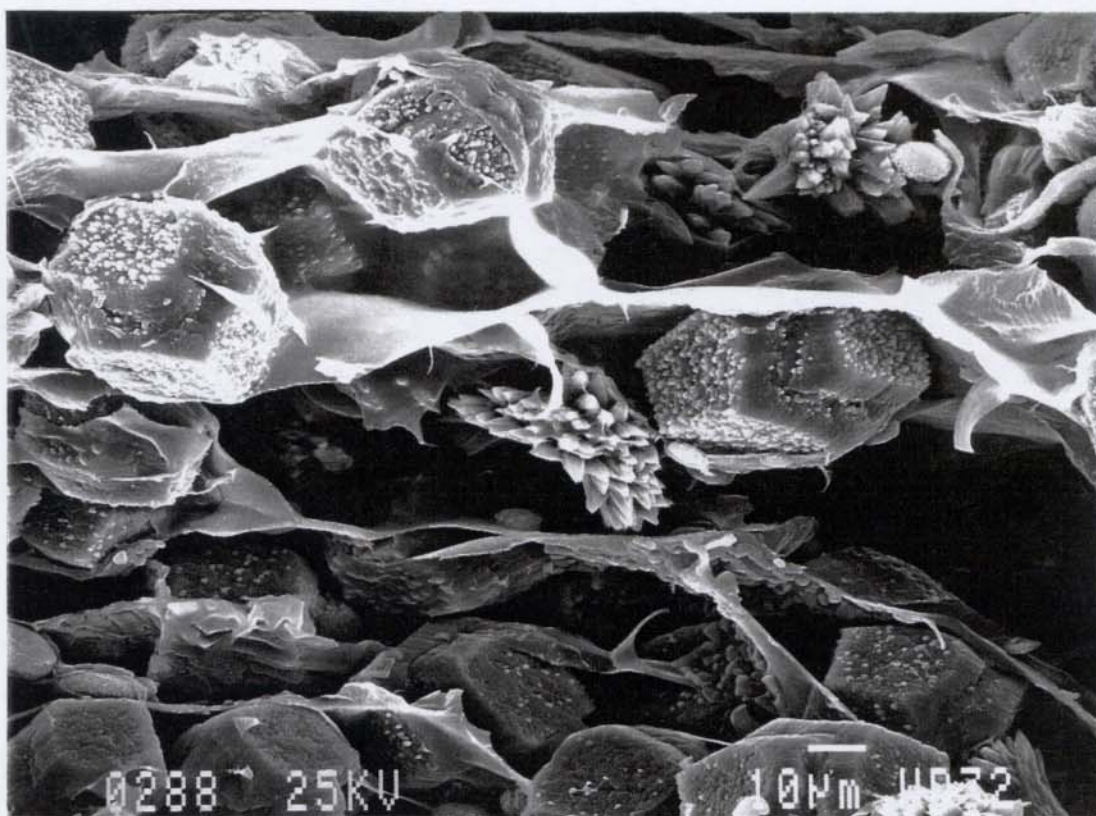


Figura 28: AL-08, mostrando predominância de cristais romboédricos e algumas lenticulas.
(FMC/LME-IF USP)

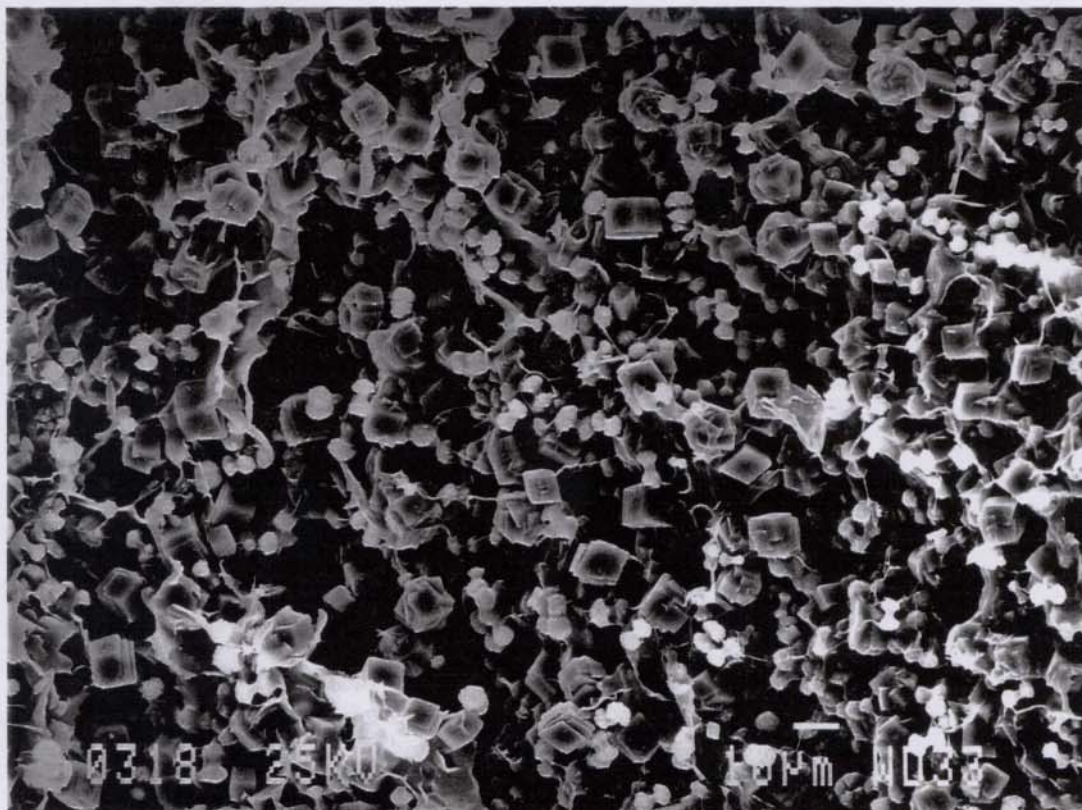


Figura 29: Acima: amostra AL-13, onde se observa estruturas esféricas e halteriformes aciculares entre os romboedros. Abaixo: ALC01, amostra com colágeno. (FMC/LME-IF USP)

“...Quem se considerar dessa forma sentirá terror de si mesmo e, considerando-se sustido na massa que a Natureza lhe deu, entre esses dois abismos de infinito e de nada, tremerá diante desses dois portentos; e creio que sua curiosidade, transmutando-se em admiração, o fará mais disposto a contemplá-las em silêncio do que a procurá-las com presunção. Pois afinal, que é o homem na Natureza? Um nada comparado ao infinito, um todo comparado ao nada, um meio entre nada e tudo. Infinitamente distante de compreender os extremos, o fim e o princípio das coisas estão para ele invencivelmente ocultos num segredo impenetrável, incapaz de ver o nada de onde foi tirado e o infinito no qual está submerso. Que fará ele então, senão perceber qualquer aparência no meio das coisas, num desespero eterno de não conhecer nem seu princípio nem o seu fim? Todas as coisas são tiradas do nada e levadas até o infinito. - Quem seguirá essas espantosas manobras?”

Blaise Pascal – Penseés.

4 Discussão

4.1. Cristalização em solução

O método experimental utilizado, como mencionado anteriormente, foi uma adaptação de outro método para se obter solução de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ descrito em literatura[7], não sendo encontrada, até o momento, nenhuma descrição de método idêntico ao utilizado neste trabalho. A referida literatura utiliza CO_2 gasoso sob pressão de cilindro. A utilização de gelo seco se mostrou mais prática e simples, usando-se apenas material de vidro, sem muita sofisticação. A redução do tempo de reação em relação ao da literatura (de um dia para uma hora) foi obtida porque o procedimento relatado em literatura faz o borbulhamento de CO_2 por meio de um tubo, direto na solução água/ CaCO_3 , ocasionando bolhas grandes. No método utilizado neste trabalho, são produzidas maior número de bolhas de pequeno tamanho, havendo portanto, maior área de contato na interface gás/solução, tornando mais eficiente a dissolução do gás e reduzindo assim, o tempo de reação.

As soluções assim preparadas e colocadas em béqueres foram mantidas cobertas para evitar que partículas de poeira precipitassem sobre a superfície, originando centros de nucleação heterogêneos[39]. Quando as soluções eram mantidas totalmente cobertas, observou-se retardo na formação de cristais. Assim, manteve-se a tampa ligeiramente erguida,

ou, em alguns casos onde se utilizou folhas de alumínio, fez-se perfurações no papel, para favorecer o escape de CO_2 proveniente da decomposição de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ em CaCO_3 e CO_2 .

A obtenção de calcita foi realizada sem dificuldades. De forma geral, os cristais formados na superfície da solução, quando observados em microscópio óptico, estavam agregados entre si, formando longas cadeias de cristais distribuídos aleatoriamente. Deve-se frisar que os cristais de CaCO_3 se formaram tanto na superfície da solução como nas paredes dos béqueres. Assim, por mera comodidade, a coleta de amostras se restringiu apenas àquele que se formaram na superfície da solução.

Tal como descrito em literatura[7, 9], íons magnésio atuam como inibidores de crescimento de cristais. Isto se mostrou visível, pois a quantidade de cristais formados sem a presença de magnésio sempre era proporcionalmente maior que naqueles onde o magnésio estava presente.

No caso da obtenção de aragonita, houve dificuldade em identificá-la em função de que a literatura consultada não descrevia a forma dos cristais;[7, 9] ou não coincidia com os obtidos[2]. Além disso, devido às contaminações iniciais, sua observação ao microscópio óptico era dado como sendo produto de contaminação e não como produto de interesse, pois os cristais se mostraram na forma de “ouriços” esféricos. A conclusão de que estes “ouriços” eram o produto de interesse se deu apenas após a execução de uma replicata, onde as condições experimentais impediam o surgimento de microorganismos, devido ao tratamento com hipoclorito de sódio e onde se estendeu o período de incubação por duas semanas. No final da primeira semana de incubação, quando uma amostra foi coletada para ser observada em microscópio óptico, notou-se apenas os cristais na forma de “dente de cão”. Porém, ao final da segunda semana, observando nova amostra, esta apresentou uma predominância de “ouriços” e, em menor proporção, os cristais denominados “dentes de cão”. Uma amostra foi coletada para análise de difração de raios-X, sendo o resultado comparado com os padrões de calcita e aragonita[40], confirmando a presença simultânea dos dois tipos de cristais. A forma de “dente de cão”, de acordo com a literatura[41], apesar de seu formato aparentemente diferente dos romboedros habituais de calcita, é constituída de minúsculos romboedros deslocados, como é ilustrado pela figura 30:

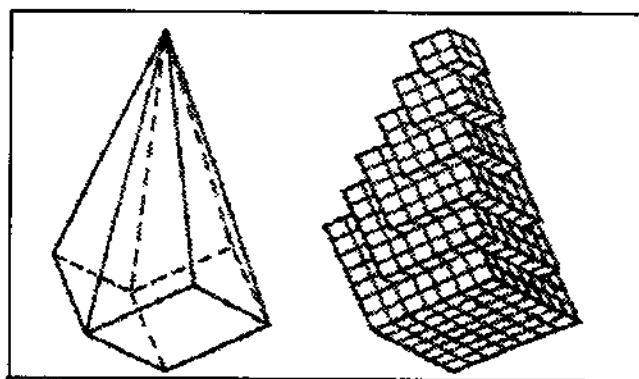


Figura 30: disposição dos cristais de calcita de modo a formar a estrutura denominada “dente de cão”(fonte: ref.41).

4.2. Cristalização em suportes sólidos

Cristalização em parafina

Os experimentos de cristalização em parafina mostraram pouca ou nenhuma deposição de cristais, com apenas alguns cristais esparsos, preferencialmente nas bordas e quase nenhum na face inferior, voltada para a solução. Os pontos onde cristais se formaram, na parte mais central da face em contato com a solução, pareceram coincidir com aqueles onde se dava o surgimento de pequenas bolhas de gás. Porém, não foi realizada nenhuma análise mais apurada

Cristalização em polietileno

O polietileno apresentou uma melhor deposição de carbonato de cálcio, porém, tal como no caso da parafina, ocorreu preferencialmente nas bordas. Comparativamente, houve precipitação de maior número de cristais, tanto no interior como nas bordas do polietileno do que na parafina.

Walton[39], explica que a precipitação de polímeros como o polietileno sobre cristais iônicos, provavelmente se dá via formação de interação entre o cristal iônico e o polietileno por dipolos induzidos no polímero, causado por excesso de carga positiva ou negativa da superfície do cristal, concluindo que não há a necessidade de formar uma camada reticular para a nucleação heterogênea de polímero no substrato e presumivelmente, vice-versa. A explicação

mais plausível para os fatos observados é que, devido à uma certa organização cristalina no polietileno, formem-se centros nucleadores onde os cristais de CaCO_3 podem crescer, dispersando o excesso de carga superficial, enquanto que a parafina, por ser mais amorfa, dificulte a cristalização.

Existe ainda, a possibilidade de que aditivos presentes na formulação básica do polietileno ainda estivessem presentes, mesmo com o tratamento com HCl , sendo estes aditivos os responsáveis pela ocorrência de um maior número de cristais neste substrato.

Cristalização em membrana de ovo

A casca de ovos de ave é estruturalmente composta por matriz orgânica e por carbonato de cálcio, fabricada rápida e seqüencialmente no oviduto em menos de 24 h. A parte mineral é constituída de calcita, com pequena quantidade de hidroxiapatita e vaterita. Morfologicamente, os cristais de calcita se organizam formando estruturas colunares com 20 μm de largura e 100-200 μm de altura, sendo um excelente material de estudo do processo de biomineralização[43].

Dentro deste contexto, os experimentos utilizando a membrana de ovo mostraram melhores resultados em relação aos outros substratos. Os cristais de calcita se depositaram sobre toda a superfície da membrana em contato com a solução, ocorrendo até sobreposição de cristais, como mostrado nas micrografias de microscopia óptica. Estes resultados podem ser explicados pela relativa cristalinidade do substrato, o qual funciona como iniciador de nucleação[39], reforçado pela presença de proteínas, cujos grupos carboxílicos livres coordenam com os íons cálcio, estabilizando a carga superficial dos cristais em formação[25, 39].

Ao se observar uma amostra de membrana de ovo por microscopia óptica, notou-se nas bordas da amostra “franjas” constituídas do que aparenta ser o mesmo material da membrana, como mostra a figura 30. Esta observação leva a crer que a sobreposição dos cristais, como mostrado na figura 31, é causada pela deposição dos mesmos sobre a região mais densa do substrato e simultaneamente sobre as franjas. Caso contrário, seria de se esperar que os cristais formados sobre a parte mais densa fossem envolvidos pelos filamentos da região

de franja, ocasionando a formação de somente uma camada de cristais acima dos já depositados.

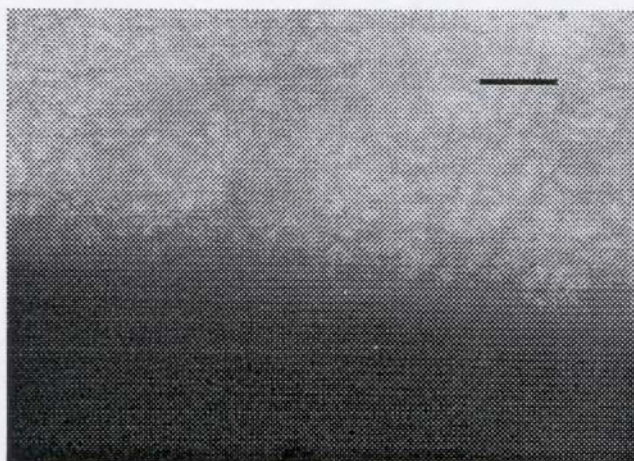


Figura 31: Micrografia de amostra de membrana de ovo, mostrando a região de “franjas”. A barra de aumentos corresponde a 1 μm .

É possível que a adição de ácidos carboxílicos à parafina e ao polietileno melhore a capacidade de ancoramento de cristais, porque estes ácidos muito provavelmente alterará as superfícies apolares da parafina e do polietileno, permanecendo com a parte carboxílica voltada para fora das superfícies do substrato, complexando com os íons cálcio, como mostrado na página 5. Ainda assim, restam dúvidas de como se poderia sobrepor novas camadas de cristais sobre estes substratos.

4.3. Cristalização em gel

O trabalho com anéis de Liesegang surgiu da suposição de que o fenômeno de biomineralização está associado a uma forma de cristalização periódica, como já foi sugerido por Morse, em 1930[33]. Apesar de ser um fenômeno conhecido há mais de 100 anos, seu estudo tem se restringido apenas à pesquisa acadêmica, sem nenhuma menção à aplicabilidade do fenômeno em termos práticos. Em vista disto, foi concebida uma abordagem experimental com o objetivo de se obter um material sólido a partir da formação de anéis de Liesegang.

Durante a revisão bibliográfica, foi encontrada apenas uma referência[34], na qual o autor versa sobre a formação de anéis de Liesegang com carbonato de cálcio e, mesmo assim,

utilizando apenas soluções líquidas, tanto de eletrólito interno como externo. Ainda uma outra referência[35] sobre o assunto, comunica pesquisa em andamento com hidroxiapatita e colágeno, porém não foi encontrada nenhuma outra referência subsequente à esta comunicação.

Assim, toda uma metodologia própria, de base empírica, foi desenvolvida para este trabalho, desde a fixação das proporções dos eletrólitos interno e externo, quanto à concepção da montagem do reator. No caso da montagem do reator, pretendeu-se simular uma condição dinâmica, com constante troca de um dos reagentes, porém *grosso modo*, é apenas uma variação em escala maior dos experimentos em tubos de ensaio. Uma alternativa não abordada neste trabalho, que estaria mais próxima do ideal, seria a de que a solução de eletrólito externo não retornasse ao erlenmeyer.

Os anéis de Liesegang formados estão de acordo com a teoria formulada por Ostwald, no sentido de que o espaçamento entre as bandas aumentam à medida em que a frente de cristalização vai progredindo pelo gel. Existem casos onde a teoria de Ostwald falha, onde o espaçamento entre as bandas diminui[44] ou há a formação de espirais[45], não existindo nenhum modelo teórico de consenso para explicá-los[30].

Como já foi mencionado, a escolha do reagente a ser utilizado como eletrólito interno e externo, de modo geral é indiferente[30], porém neste trabalho foi observado que a adição de carbonato de sódio como eletrólito interno produz alteração na coloração do gel de ágar, a qual de cor ligeiramente amarelada, é convertida lentamente para castanho escuro.

Os resultados experimentais mostram que abaixo de 25 °C não há ocorrência de anéis de Liesegang. É sabido que tanto a solubilidade do precipitado, como a velocidade de difusão são afetados pela temperatura. De acordo com Isemura[34], o aumento de temperatura provoca redução do número relativo de bandas, havendo aumento do espaçamento entre elas. Porém, este aspecto dos resultados ainda não foi bem esclarecido.

De acordo com Silva [30], a concentração dos eletrólitos devem superar o valor de supersaturação do produto formado, havendo contestação a este respeito[43]. Além disso, o eletrólito externo deve possuir uma concentração relativamente mais elevada que o eletrólito interno[30]. Em vários experimentos deste trabalho, a concentração relativa do eletrólito externo foi menor que do interno (0,02/0,03 moles/L ou 5,00/10,00 g/400 mL), não havendo no momento uma explicação para o fato.

As análises de difração de raios-X indicam a formação de calcita, predominantemente, com presença de aragonita, nos experimentos onde foi utilizado $MgCl_2$. Este fato pode ter relação com as observações experimentais na obtenção de aragonita em solução (pág. 42), que mostraram a necessidade de um maior tempo para a formação de aragonita, porém nada se tem de conclusivo.

A presença de aragonita nos sólidos obtidos, seja nos experimentos onde foram observados anéis, seja naqueles onde se formou uma faixa contínua, é confirmada pela difração de raios-X e observada nas micrografias eletrônicas de varredura (MEV). Nas micrografias MEV a aragonita se apresenta como grupos aciculares, orientados radialmente (figura 26) ou em uma disposição quase paralela (figura 29). Quanto às demais estruturas observadas, isto é, as estruturas lenticulares (figura 25 e 28) e esféricas (figura 27), foram encontrados dois trabalhos na literatura[48, 49] onde os autores obtiveram resultados análogos em termos de morfologia. De acordo com estes autores, a morfologia dos cristais é provavelmente alterada pela adsorção de substâncias orgânicas (ácidos carboxílicos) ou por substituição isomórfica dos íons cálcio por íons magnésio[49]. Como não foi utilizado nenhum outro aditivo além do sal de magnésio, supomos que a alteração do hábito cristalino se deu por substituição isomórfica do Ca^{++} por Mg^{++} . Assim, apesar do hábito cristalino não ser aquele típico de calcita (romboedros) a sua estrutura cristalina é de calcita, como indica a análise de difração de raios X.

As propriedades mecânicas dos sólidos obtidos por secagem foram semelhantes, independentemente de terem sido obtidos de géis com ou sem anéis, ou com ou sem $MgCl_2$. Por outro lado, a adição de colágeno mostrou uma aparente melhora do produto final, no que tange à resistência à fratura. Como já foi mencionado anteriormente, o ágar, composto por agarose e agarpectina, coordena com os íons cálcio, diminuindo a densidade de carga superficial dos cristais formados, ocasionando uma aderência entre os cristais e o substrato[25]. O colágeno por sua vez, deve aumentar a resiliência do material. De acordo com Coyne e colaboradores[38], a secreção utilizada por mexilhões para se fixarem em rochas (bisso) é constituída de colágeno, portanto, é provável que a sua inclusão na estrutura do material obtido tenha melhoria de propriedades mecânicas, mesmo que o colágeno utilizado não seja quimicamente idêntico ao produzido por mexilhões.

Com que propósito devo me preocupar com a procura dos segredos das estrelas, tendo a morte e a escravidão continuamente diante dos meus olhos?

Anaximenes (ca. 600 A.C.)

5. Conclusões

Foram obtidos cristais de calcita e aragonita pelo método de cristalização a partir de solução supersaturada de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$, confirmando as observações relatadas por Kitano[7], ou seja, a adição de MgCl_2 à solução supersaturada de bicarbonato de cálcio afeta a cristalização do carbonato de cálcio.

Nos experimentos de cristalização em solução contendo MgCl_2 , foi observado inicialmente apenas a presença de cristais de calcita com hábito cristalino denominado "dente de cão" e, após certo tempo é observado a predominância de aragonita. Assim, nas condições experimentais utilizadas, a aragonita torna-se termodinamicamente mais estável que a calcita, embora o ΔG^0 de formação da calcita seja um pouco menor que o da aragonita. Ainda se faz necessário um estudo mais aprofundado sobre o tema para se poder fazer afirmações mais categóricas a respeito do porque a aragonita se forma, pois em tese os cristais de calcita formados inicialmente deveriam direcionar a cristalização apenas para a formação do mesmo.

Nas soluções contendo MgCl_2 houve a necessidade de evitar contaminações de microorganismos, contornado pela adição de hipoclorito de sódio às soluções, contudo, adição de hipoclorito de sódio possui o inconveniente de alterar quimicamente (oxidação) os possíveis aditivos orgânicos que porventura sejam acrescentados à solução,

A cristalização em suportes sólidos, por sua vez, demonstra que a membrana de casca de ovo é um bom substrato para deposição de carbonato de cálcio, com tendência a formar várias camadas cristalinas. O polietileno demonstrou pouca deposição e a parafina foi o substrato mais ineficiente. É possível que a adição de ácidos carboxílicos à parafina e ao polietileno melhore a capacidade de ancoramento de cristais, porque estes ácidos muito provavelmente alterarão as superfícies apolares da parafina e do polietileno.

Quanto à cristalização em gelatina de ágar, foi observado o fenômeno de precipitação periódica, conhecido como anéis de Liesegang. Foi constatada a importância da temperatura e concentração dos eletrólitos para o aparecimento deste fenômeno. Por este método foi possível a obtenção de um material sólido pela secagem da gelatina de ágar contendo cristais

de CaCO_3 , seja onde foi observado o fenômeno denominado anéis de Liesegang, seja onde este não ocorreu. Os cristais formados apresentaram uniformidade de tamanho e orientados aleatoriamente quando observados em microscópio eletrônico de varredura. A adição de MgCl_2 ao meio reacional também afeta o hábito cristalino do carbonato de cálcio formado, porém sem haver uniformidade de hábito. A literatura consultada[48, 49] pouco revela sobre o assunto, sendo que a cristalização com mudança de hábito é explicado através de substituição isomórfica de Ca^{++} por Mg^{++} . Pela técnica de difração de raios X foi possível verificar a formação de calcita nos experimentos isentos de MgCl_2 e de uma mistura de calcita e aragonita nos casos onde este sal foi adicionado.

Acredita-se que um estudo mais detalhado da síntese de carbonato de cálcio associado aos anéis de Liesegang (p.ex.: concentração de reagentes, adição de aditivos orgânicos direcionadores de cristalização), podem realmente levar a novos materiais com características inusitadas e com largo espectro de aplicabilidade.

6. Bibliografia

- [1] Mann, S. e Heywood, B. R.; "Cristal Engineering at Interfaces."; Chem. Brit.; No 07 (1989), 698-712;
- [2] Falini, G.; Albeck, S.; Weiner, S. e Addadi, L.; "Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusc Shell Macromolecules."; Science; vol 271, No 01 (1996), 67-69;
- [3] Ochiai, Ei-Ichiro; "Principles in Bioinorganic Chemistry."; J. Chem. Educ.; vol 55, No 10 (1978), 631-633;
- [4] Giles, R.; Manne, S.; Mann, S.; Morse, D. E.; Stucky, G.D. e Hansma, P.K.; "Inorganic Overgrowth of Aragonite on Molluscan Nacre Examined by Atomic Force Microscopy."; Biol. Bull., vol 188 (1995), 8-15;
- [5] Weiner, S. e Addadi, L.; "Design strategies in mineralized biological materials"; J. Mater. Chem. Vol 07, No 05 (1997), 689-702;
- [6] Jamieson, J.C.; "Phase Equilibrium in the System Calcite-Aragonite."; J. Chem. Phys.; vol 21, No 08 (1953), 1385-1390;
- [7] Kitano, Y.; "The Behaviour of Various Inorganic Ions in the Separation of Calcium Carbonate from a Bicarbonate solution"; Bull. Chem. Soc. Japan, vol 35, No 12 (1962), 1973-1980;
- [8] Titiloye, J.O., Parker, C.S., Osguthorpe, D.J. e Mann, S.; "Predicting the Influence of Growth Additives on the Morphology of Ionic Crystals."; J. Chem. Soc., Chem. Comm; (1991), 1494-1496;
- [9] Kitano, Y.; Kanamori, N. e Tokuyama, A.; "Effects of Organic Matter on Solubilities and Crystal Form of Carbonates."; The Zoologist; No 09 (1969), 681-688;
- [10] Mann, S.; "Molecular recognition in Biomineralization."; Nature; vol 332, No 03 (1988), 119-124;
- [11] Mann, S.; "Biomineralization of Iron Oxides."; Chem. Brit.; No 02 (1987), 137-140;
- [12] Mann, S. e Perry, C.C.; "Solid-State Inorganic Chemistry: mechanisms and Models of Biomineralization."; Adv. Inorg. Chem.; vol 36 (1991), 137-200
- [13] Wilbur, K.M. e Bernhardt, A.M.; Effects of Amino Acids, Magnesium, and Molluscan Extrapallial Fluid on Cristallization of Calcium Carbonate: *In Vitro* Experiments."; Biol. Bull.; vol 166, No 02 (1984) 251-259;

- [14] Borbas, J.E.; Wheeler, A. P. e Sikes, C.S.; "Molluscan Shell Matrix Phosphoproteins: Correlation of Degree of Phosphorylation to Shell Mineral Microstructure and to *In Vitro* Regulation of Mineralization."; J. Exp. Zool. vol 258, (1991), 1-13;
- [15] Zaremba, C.M.; Belcher, A.M.; Fritz, M.; Li, Y.; Mann, S.; Hansma, P.; Morse, D. E.; Speck, J.S. e Stucky, G. D.; "Critical Transitions in the Biofabrication of Abalone Shells and Flat Pearls."; Chem. Mater.; vol 08, No 03 (1996), 679-690;
- [16] Crick, R. E.; "Origin, Evolution and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals."; Plenum Press, N.Y, (1989);
- [17] Ishay, J.S., Shimony, T. e Arcan, L.; "The Biomineralization in Social Wasps (*Vespinae*): The Presence of Statoliths."; Scann. Elect. Microsc.; No 04 (1986), 1619-1634;
- [18] Evans, J.; Bringas Jr., P.; Nakamura, M.; Nakamura, E.; Santos, V. e Slavkin, H.C.; "Metabolic Expression of Intrinsic Developmental programs for Dentine and Enamel Biomineralization in Serumless, Chemically-Defined Organotypic Culture."; Calcif. Tissue Int.; vol 42, No 04 (1988), 220-230;
- [19] Dauphin, Y.; Marin, F.; Gautret, P. e Cuif, J-P.; "Discrimination des Biominéralisations Aragonitiques Fibreuses des Spongiaires, Cnidaires et Mollusques, par l'indice de Substitution des Éléments Mineurs dans le Réseau Carbonaté."; Comptes Rendus; vol 311, No 02 (1990) 1111-1116;
- [20] Tazaki, K.; "Bacterial Biomineralization."; Kobutsugaku Zashi, vol 20, No 03 (1991), 93-104;
- [21] Kim, K.S.; Webb, J.; Macey, D. e Cohen, D.D.; "Compositional Changes During Biomineralization of the Radula of the Chiton *Clavarizona hirtosa*."; J. Inorg. Biochem.; vol 28, No 02-03 (1986), 337-545;
- [22] Krampitz, G.P. e Grazer, G.; "Molecular Mechanism of Biomineralization in the Formation of Calcified Shells."; Angew. Chem. (ed. ingl); vol 27, No 09 (1988), 1145-1156;
- [23] Kawabata, Y.; "Biomineralization: Mechanisms and Models."; Kagaku Ginjutsu Kenkyusho Hokoku; vol 85, No 02 (1990), 31-43;
- [24] Addadi, L.; Moradian, J.; Shay, E.; Maroudas, N.G. e Weiner, S.; "A Chemical Model for de Cooperation of Sulfates and Carboxylates in Calcite Crystal Nucleation: Relevance in Biomineralization."; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.; vol 84, No 09 (1987), 2732-2736.;
- [25] Ochiai, Ei-Ichiro; "Biomineralization."; J. Chem. Educ.; vol 68, No 08 (1991), 627-630;

- [26] Wheeler, A.P.; Rusenko, K.W.; George, J.W. e Sikes, C.S.; "Evaluation of Calcium Binding by Molluscan Shell Organic Matrix and its Relavance to Biomineralization."; *Comp. Biochem. Physiol.*, vol 87B, No 04 (1987), 953-960;
- [27] Fritz, M.; Belcher, A.M.; Radmacher, M. Walters, D.A.; Hansma, P.K; Stucky, G.D.; Morse, D.E. e Mann, S.; "Flat Pearls from Biofabrication of organized Composites on Inorganic Substrates."; *Nature*; vol 371, No 09 (1994), 49-51;
- [28] Levi, Y.; Albeck, S.; Brack, A.; Weiner, S. e Addadi, L.; "Control Over Aragonite Crystal Nucleation and Growth: An In Vitro Study of Biomineralization."; *Chem. Eur. J.*; vol 04, No 03 (1998), 389-395;
- [29] Mann, S.; Didymus, J.M.; Sanderson, N.P. e Heywood, B.R.; "Morphological Influence of Functionalized and Non-Functionalized α,ω -Dicarboxylates on Calcite Crystallization."; *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.*; vol 86, No 10 (1990), 1873-1880;
- [30] Silva, A. J. R.; "Estudos teóricos sobre formação de pradrões espaciais : Anéis de Liesegang."; *Dissertacao (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin.*(1989), 12-19;
- [31] Liesegang, R.E.; "Chemische Reaktionen in Gallerten."; *Naturw. Wochshr.*; vol 11 (1896), 353;
- [32] Isemura, T.; "Studies on Rythmic Precipitates"; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*; vol 14, No 05 (1939), 179;
- [33] Morse, H.W.; "Periodic Precipitation in Ordinary Aqueous Solutions"; *J. Phys. Chem.*; vol 34 (1930), 1554-1577;
- [34] Gore, V.; "Liesegang'sche Ringe in nicht gelartigen Medien."; *Kolloid Z.*; vol 76, No 03 (1936), 331-333;
- [35] Kniep, R. e Busch, S.; "Biomimetic growth and self-assembly of fluorapatite aggregates by diffusion into denaturated collagen matrices"; *Angew. Chem. (ed. Ingl.)*; vol 22, No 35 (1996), 2624-2626;
- [36] Ostwald, W.; "Lehrbuch der Allgemeinen Chemie"; Engelman, Leipzig (1897)
- [37] Hawley, G.G; "The Condensed Chemical Dictionary", 8^a ed; Van Nostrand Reinhold Company; NY, 1971;
- [38] Coyne, K.J.; Qin, X.X.; Waite, J.H.; "Extensible Collagen in Mussel Byssus: A Natural Block Copolymer"; *Science*; vol 277, No 5333 (1997), 1830-1832;

- [39] Walton, A.G.; "The Formation and Properties of precipitates." - Chemical Analysis (seriado), vol 23; Interscience Publishers; NY (1967), capítulo I;
- [40] Biblioteca informatizada JCPDS (Powder Diffraction File – Joint Commitee on Powder Diffraction Standards) – Publication SMA-23, 1973
- [41] Bunn, C.; "Cristais – Seu papel na natureza e na ciência"; Cia Editora Nacional e Edusp; SP (1972), pp. 12 e 13;
- [42] Dennis, J.E.; Xiao, S.Q.; Agarwal, M.; Fink, D.J.; Heuer, A.H. e Caplan, A.I.; "Microstructure of Matrix and Mineral Components of Eggshells From White Leghorn Chickens (*Gallus gallus*); J. Morphol.; No 228 (1996), 287-306;
- [43] Flicker, M e Ross, J.; " Mechanism of chemical instability for periodic precipitation phenomena."; J. Chem. Phys.; vol 60 (1974), 3459;
- [44] Brand, H.R.; Wesfreid, J.E. Azouni, M.A. e Kai, S. "Spirals with a continuously changing pitch in non-equilibrium system. "; Chem. Phys. Lett. No 126 (1986). 447;
- [45] Bradford, S.C.; Kolloid Z.; vol. 30 (1922), 364;
- [46] Dahr, N. R. e Chatterji, A.C.; Kolloid Z.; vol. 31 (1922), 15;
- [47] Shinohara, S. J. Phys. Soc. Japan; vol. 37 (1974), 264;
- [48] Wada, N.; Okazaki, M. e Tachikawa, S.; "Effects of calcium-binding polysaccharides from calcareous algae on calcium carbonate polymorphs under conditions of double diffusion"; J. Crystal Growth; vol.132 (1993), 115-121;
- [49] Wada, N.; Yamashita, K. e Umegaki, T.; "Effects of Carboxilic Acids on Calcite Formation in the Presence of Mg^{2+} Ions."; J. Coll. Int. Sci.; vol.212 (1999), 357-364.
- [50] Kürther, J.; Seshadri, R. Knoll, W. e Tremel, W.; "Templated Growth of Calcite, Vaterite and Aragonite Cristals on Self-Assembled Monolayers of Substitute Alkylthiols on Gold"; J. Mater. Chem.; No 8, vol 3 (1998), 641-650.