Scientia Chromatographica Vol.2, N°2, 5-9, 2010
Instituto Internacional de Cromatografia
ISSN 1984-4433

O Aperfeiçoamento da cromatografia em camada delgada

Carol H. Collins

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química
13083-970 Campinas (SP)

Resumo

Este artigo sobre os "Pilares de Cromatografia" descreve os aperfeiçoamentos da técnica de cromatografia em camada delgada desde a época em que Stahl demonstrou a repetibilidade da técnica ao constatar que as espessuras das camadas das fases estacionárias preparadas tornaram-se reprodutíveis. Isso desencadeou várias modificações que resultaram na cromatografia em camada delgada de alta e, mais recentemente, de ultraeficiência e em sistemas que pressurizam as fases móveis, permitindo desenvolvimentos mais rápidos e uniformes.

Palavras-chave

História da cromatografia; Cromatografia em camada delgada; Cromatografia em camada delgada de alta eficiência; Cromatografia em camada delgada de ultraeficiência; Cromatografia em camada delgada pressurizada.

Abstract

This chapter of "Pillars of Chromatography" describes improvements in the technique of thin layer chromatography that took place after Stahl had shown its repetibility when the stationary phase layers were reproducible. This initiated other modifications that resulted in high performance and, more recently, ultra peformance stationary phases and in pressurized development systems that provide more rapid and uniform development.

Keywords

History of chromatography; Thin layer chromatography; High performance thin layer chromatography; Ultra peformance thin layer chromatography; Pressurized thin layer chromatography.

*e-mail: chc@iqm.unicamp.br

A cromatografia planar iniciou-se com os "desenhos" que F.F. Runge desenvolveu em papel, na metade do século dezenove. A cromatografia em papel foi redescoberta por A. J. P. Martin e colaboradores na metade do século vinte (1). Porém, as restrições da cromatografia em papel, especialmente relacionadas às limitações nos tipos de fase estacionária e às dificuldades em se ter repetibilidade entre as corridas, impulsionaram o desenvolvimento de uma outra técnica planar, a da cromatografia em camada delgada (CCD), cujo início data do fim do século dezenove, e sua aceitação como técnica útil para química, da metade do século vinte (2). Entretanto, essa técnica também apresentou diversos problemas durante o seu início, os quais foram resolvidos com o passar do tempo. O primeiro avanço foi o uso de aderentes misturados às fases estacionárias sólidas, o que permitiu o fácil manuseio das placas. O desenvolvimento por eluição, descrito por J. G. Kirchner, e a produção das placas com espessuras controladas e reprodutíveis, utilizando os processos descritos por E. Stahl, e rapidamente comercializadas, permitiram que a cromatografia em camada delgada assumisse um papel importante entre as técnicas de separações, possibilitando comparações rápidas, porém qualitativas, entre diversas amostras a partir da metade do século passado (2).

Uma vez aceito o conceito da CCD, vários fabricantes e pesquisadores trabalharam no sentido de aperfeiçoar as separações. Iniciou-se o uso de folhas de plástico (3) ou de alumino que, junto com as placas de vidro, foram confeccionadas com diversas fases estacionárias, incluindo, além da sílica, celulose, alumina, poliamida e trocadores de íons. A gipsita foi substituída por amida, que apresentou melhor uniformidade, e a espessura foi reduzida para 100 μm, melhorando a resolução e a detectabilidade (4).

A sílica gel "tipo Stahl para CCD" e as outras fases estacionárias disponibilizadas pelas diversas firmas apresentavam uma larga faixa de tamanho de partícula: 10 a 60 μm, com média em torno de 20 μm. Essa foi a faixa mais fina obtida ao se utilizarem peneiras de malha para seleção de tamanho. Em 1968, J.A. Thoma (5) propôs que partículas com tamanhos menores e mais uniformes poderiam melhorar a resolução. Paralelamente, diversas firmas trabalharam para preparar partículas com diâmetros reduzidos para o uso em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sintetizando partículas com diâmetros médios de 10 e 5 μm. Com as pequenas partículas disponíveis, as firmas que produziam as placas com fases estacionárias para CCD empenharam-se para desenvolver processos que permitissem preparar placas com essas novas partículas (6). Assim, nasceu a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), que utiliza placas de 10 cm × 10 cm e partículas de 5 μm, em vez das placas de 20 cm × 20 cm com as partículas maiores. Essa nova modalidade ainda permitiu a aplicação de um número maior de manchas a serem separadas, com o desenvolvimento da placa de somente 3-5 cm (Figura 1a), resultando em diâmetros menores e mais reprodutíveis das manchas desenvolvidas. As novas placas também permitiram a aplicação e o subsequente desenvolvimento das manchas com desenvolvimento circular (Figura 1b) e de bandas de amostra (Figura 1c), que melhoraram a detecção de quantidades pequenas.

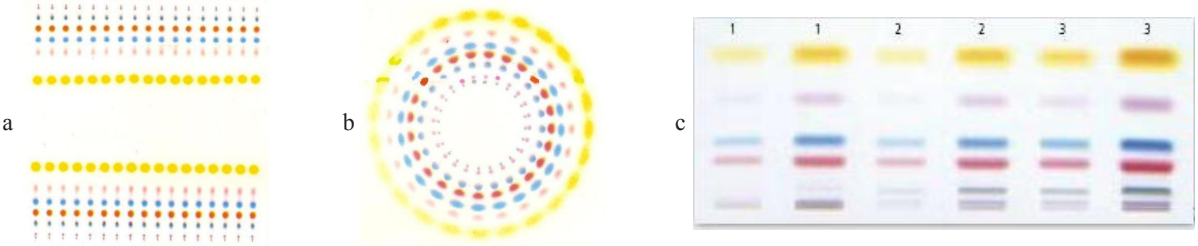

Figura 1. Desenvolvimentos de uma mistura de tintas em placas de CCDAE. (a) desenvolvimento horizontal de manchas aplicadas nos dois lados da placa; (b) desenvolvimento circular de manchas aplicadas em um círculo ao redor do centro, no qual a fase móvel foi gotejada; (c) desenvolvimento de amostras aplicadas em bandas.

Mais recentemente, placas com partículas de 2 ou 3 μm foram comercializadas, bem como placas com uma camada de sílica monolítica com uma espessura de 10 μm, macroporos de 1 – 2 μm, mesoporos de 2 a 4 nm e uma área superficial específica de ~350 m^2/g. Tal modalidade é chamada por seu fabricante, Merck, de *ultra peformance thin layer chromatography* (cromatografia em camada delgada de ultraeficiência, CCDUE).

Também, paralelamente ao desenvolvimento das fases estacionárias quimicamente ligadas para CLAE, fases similares foram introduzidas nas placas de CCDAE (7). Hoje, todas as fases estacionárias para CLAE são disponíveis para uso em CCDAE, incluindo as fases normais (sílica, amino e ciano), reversas (C2, C8 e C18), hidrofílicas, quirais, de troca iônica e de exclusão por tamanho. Uma modificação interessante são as placas bifásicas, com duas fases estacionárias diferentes (Figura 2), que permitem uma separação em duas dimensões ortogonais (CCDAE × CCDAE) (8).

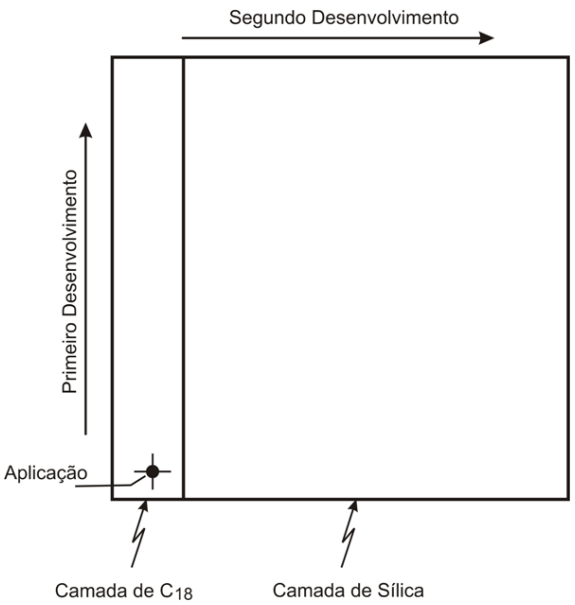

Figura 2. Desenho de uma placa bifásica. A faixa menor contém uma fase estacionária, e a maior, outra fase estacionária. O desenvolvimento é realizado em duas dimensões.

O uso das placas de CCDAE requereu que o volume de amostra a ser aplicado à placa fosse reduzido de uma ordem de grandeza (~200 nL). Para esse fim, foram desenvolvidos sistemas que permitiram a aplicação mecânica das amostras em volumes controlados, e a secagem das manchas por um fluxo de gás, às vezes acompanhada por um leve aquecimento do fundo da placa horizontal. O primeiro desses sistemas foi comercializado em 1972 (9). Esses melhoramentos reduziram significantemente os erros inerentes à aplicação manual e induziram a criação de sistemas para desenvolvimentos mais repetitivos e sistemas para quantificação das manchas obtidas nas corridas.

Antes de as placas de CCDAE se tornarem universalmente disponíveis, Perry e colaboradores (10-12) criaram um sistema para desenvolvimento múltiplo programado, que conseguiu reduzir o tamanho das manchas após o desenvolvimento, especialmente daquelas que percorreram distâncias maiores. A placa foi colocada no aparelho (Figura 3) na posição vertical, 15 cm ao redor de um refletor com duas lâmpadas de aquecimento. As manchas foram aplicadas na placa a 2,5 cm do seu início, e a fase móvel atingia uma altura de 1,5 a 2 cm em um recipiente protegido do calor das lâmpadas. O processo implicou um desenvolvimento inicial de alguns segundos (ou minutos) sem aquecimento. Após esse tempo, as lâmpadas foram ligadas por um período curto, com ou sem um fluxo simultâneo de gás inerte, para evaporar a fase móvel que avançava na placa. As lâmpadas foram desligadas, e o desenvolvimento foi reiniciado; porém, dessa vez, por um período maior antes que as lâmpadas fossem novamente ligadas.

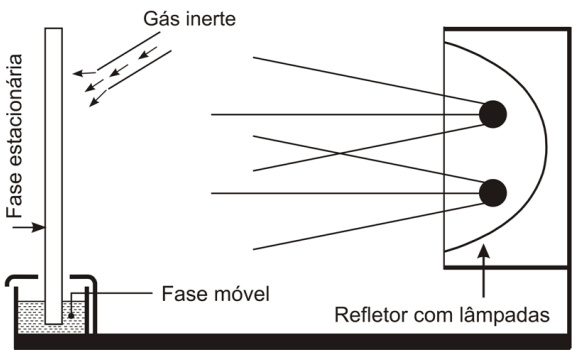

Figura 3. Desenho do aparelho para desenvolvimento múltiplo programado. Adaptado da referência 11.

Esse ciclo de desenvolvimento com a fase móvel avançando, seguido por secagem após um tempo controlado, foi repetido até que se conseguisse a separação desejada. A Figura 4 compara a separação obtida, utilizando as mesmas fases estacionárias, com uma corrida simples e com um desenvolvimento múltiplo programado, sendo que o último mostra manchas com diâmetros reduzidos. Esse é o resultado do decréscimo do desenvolvimento na direção longitudinal, sendo que, em cada etapa do processo, a fase móvel reencontra a parte da mancha mais perto do recipiente da fase móvel e começa a elui-la antes que fique em contato com o restante da mancha. O aparelho pode ter até 99 ciclos e diferentes tipos de programação.

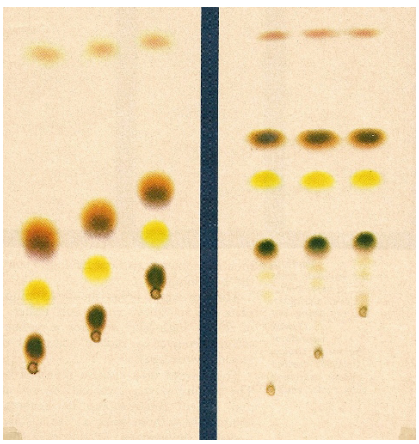

Figura 4. Comparação do desenvolvimento simples de uma amostra com desenvolvimento múltiplo programado da mesma amostra.

O desenvolvimento das placas, tanto as de 20 cm x 20 cm quanto as de CCDAE, apresenta uma desvantagem comum: as moléculas da fase móvel têm uma tendência de evaporar da frente da fase móvel durante o desenvolvimento devido ao fato de a placa estar inicialmente seca e exposta à atmosfera. Além disso, especialmente em desenvolvimento ascendente, o avanço da fase móvel depende da distância percorrida. Em outras palavras, o movimento da frente da fase móvel se reduz proporcionalmente à sua distância do recipiente da fase móvel. Ambos os fatores sofrem complicações maiores devido ao uso rotineiro de fases móveis com dois, três ou até mais componentes de volatilidades diferentes. Para resolver tal problema, H. Kalász e colaboradores (13,14) construíram sistemas para o desenvolvimento forçado em cromatografia em camada delgada (*forced flow thin layer chromatography, FFTLC*) ou pressurizado (*over pressure thin layer chromatography, OPTLC*) nos modos linear (Figura 5) ou circular.

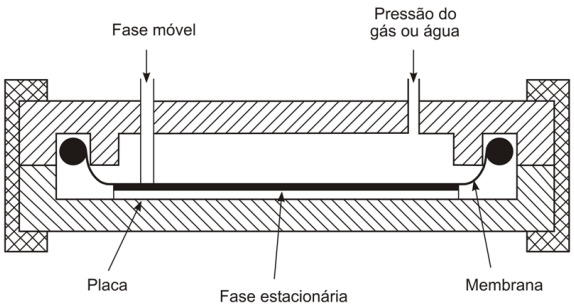

Figura 5. Desenho de um sistema para desenvolvimento de CCD pressurizada.

As amostras são aplicadas à placa com fase estacionária apropriada, e a placa é colocada na câmara do aparelho e coberta com uma membrana impermeável, selada nos dois lados, para eliminar a presença de uma atmosfera que permita volatilização. A membrana mantém-se fixa à placa, eliminando a atmosfera por uma pressão aplicada, utilizando ar, nitrogênio ou água. A fase móvel é bombeada a uma vazão constante para uma posição antes da linha de aplicação por um período suficiente para realizar o desenvolvimento desejado, visível embaixo da membrana. O uso desse tipo de sistema pressurizado apresenta a vantagem de que o desenvolvimento da placa ocorre na mesma velocidade durante toda a separação, resultando em manchas mais uniformes e reduzindo o tempo necessário para realizar a separação (Figura 6) (15). O uso de sistemas pressurizados também permite selecionar a vazão da fase móvel que providencia a melhor eficiência (Figura 7) (14). Nesse tipo de sistema, o efeito da pressão empurrando a fase móvel, que apresenta uma tendência de ter forma convexa, é compensado pelo fato de que a frente da fase móvel está passando de uma área molhada para uma área seca, que tende a ser côncava. O resultado é uma frente de fase móvel

com tendência mais linear, e com os cromatogramas resultantes mais uniformes.

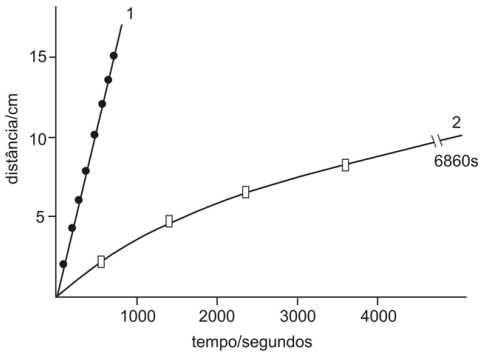

Figura 6. Variação da distância de desenvolvimento com o tempo em (1) CCDAE pressurizada (ar a 0,28 MPa) com vazão de fase móvel de 0,4 mL/min e (2) CCDAE sem pressão. Dimensões das placas: 20 cm x 20 cm; fase estacionária: sílica; fase móvel: CH_2Cl_2; distância de desenvolvimento para ambas as placas: 15 cm. Adaptado da referência 15.

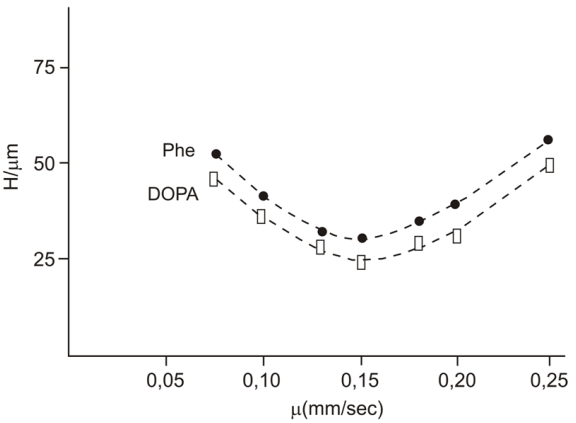

Figura 7. Curvas de eficiência *vs* vazão da fase móvel em um sistema de desenvolvimento pressurizado. Fase estacionária: sílica; fase móvel: clorofórmio:metanol: tampão fosfato, pH 6,5 (7:5:1); Phe: fenilalanina; DOPA: diidroxifenilalanina. Adaptado da referência 14.

A partir desses desenvolvimentos, as instrumentações para CCD e CCDAE evoluíram consideravelmente, sendo comercializadas por diversos fabricantes: aplicadores de manchas ou bandas, sistemas para desenvolvimentos pressurizados, detectores que utilizam cor, fluorescência, carga acoplada (*charged coupled detector*) (16) e de radioatividade para quantificação, aparelhos que eluem o conteúdo de cada mancha ou banda para determinações de estruturas por ressonância magnética nuclear ou espectrometria de massas e até diversos processos que, hoje, permitem injetar, sem vácuo, moléculas espalhadas da superfície da placa diretamente em um sistema de espectrometria de massas (17).

Referências Bibliográficas

1. C.H. Collins, Sci. Chromatogr. (São Carlos), 1, no. 4, 7 (2009).
2. C.H. Collins, Sci. Chromatogr. (São Carlos), 2, no. 1, 5 (2010).
3. E.P. Przybylowicz, W.J. Staudenmayer, E.S. Perry, A.D. Baitsholts, T.N. Tischer, J. Chromatogr. Sci. 20, 506, 1965.
4. G.E. Howard, J. Baldry, Analyst, 94, 589 (1969)
5. J.A. Thoma, em J.C. Giddings, R.A. Keller, Eds., "Advances in Chromatography", vol.6, Marcel Dekker, New York, 1968, pp.61-117.
6. H. Halppa, J. Ropphahn em A. Zlatkis, R.E. Kaiser, Eds., "HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography. Elsevier, Amsterdam, 1977, pp. 95-127.
7. T.E. Beesley em J.C. Touchstone, Ed., "Advances in Thin Layer Chromatography", Wiley, New York, 1982, pp. 1-11.
8. H.J. Issac, Trends Anal. Chem. 9, 36 (1990).
9. K. Brandt, Am. Lab. 4, 69 (1972).
10. J.A. Perry, K.W. Haag, L.C. Glunz, J. Chromatogr. Sci, 11, 447 (1973).
11. J.A. Perry, T.H. Jupille, L.C. Glunz, Anal. Chem. 47, 65A (1975)
12. J.A. Perry, J. Chromatogr. 110, 27 (1975).
13. E. Tyihák, E. Mincsovics, H. Kalász, J. Chromatogr. 174, 75 (1979).
14. H. Kalász, Chromatographia 18, 628 (1984).
15. J.M. Newman, Am. Lab. 17, 52 (1985).
16. J.E. Welke, M. Hoeltz, H.A. Dottori, I.B. Noll, J. Braz. Chem. Soc. 21, 441 (2010)
17. L.S. Eberlin, P.V. Abdelnur, A. Passero, G.F. de Sa, R.J. Daroda, V. de Souza, M.N. Eberlin, Analyst 134, 1652 (2009).