

II. Químicos redescobrem a Cromatografia Líquido-Sólido



Carol H. Collins
Editora

Carol H. Collins

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
13083-970 – Campinas (SP)
Brasil
chc@iqm.unicamp.br

Resumo

Este capítulo sobre os "Pilares de Cromatografia" descreve os avanços importantes feitos na área de Química de Produtos Naturais depois da redescoberta, em 1930, da técnica de Michael Tswett por Prof. Richard Kuhn e seu pós-doutorando Edgar Lederer. Em menos de dez anos, a cromatografia líquido-sólido se tornou o método preferido para a separação de produtos naturais e foi essencial na descoberta de alguns vitaminas.

Abstract

This chapter of "Pillars of Chromatography" describes the great advances made in Natural Products Chemistry following the "rediscovery" of Michael Tswett's separation technique by Prof. Richard Kuhn and his post-docotoral fellow, Edgar Lederer, in 1930. In less than 10 years liquid-solid chromatography became the method of choice for separation of natural products and was essential for the discovery of several vitamins.

A cromatografia líquido-sólido (CLS), isto é, a realização de uma separação pela passagem de uma solução contendo alguns compostos, usualmente não ionizados, por um sólido (fase estacionária) contido em um tubo, iniciada pela colocação da solução no topo da coluna, seguida pela passagem de um ou mais solventes puros (fase móvel), é muito aplicada para a separação, a identificação e a quantificação dos

diferentes componentes de diversos extratos de origem vegetal ou animal. O primeiro pesquisador a descrever esta aplicação da CLS foi o botânico Michael S. Tswett¹, que publicou vários trabalhos aplicando esta técnica, começando com os trabalhos publicados em 1906 que a denominou cromatografia^{2,3}. Tswett identificou as substâncias separadas pelas suas posições na coluna cromatográfica e, após remover a(s)

Palavras-chave

História de cromatografia,
Cromatografia líquido-sólido,
Química de produtos naturais,
Carotenóides

Keywords

History of chromatography,
Liquid-solid chromatography,
Natural products chemistry,
Carotenoids

banda(s) da coluna, o(s) composto(s) foi(foram) extraído(s) de cada banda e seus espectros de absorção no UV-vis obtidos. Os compostos não foram eluídos da coluna, como é comum hoje.

Nos anos após estes primeiros trabalhos de Tswett, outros pesquisadores, especialmente botânicos, aplicaram o método de Tswett com sucesso. Entretanto, os químicos da época ou não tiveram sucesso ou, simplesmente, não aceitaram o conceito. Mais de vinte anos depois de os trabalhos iniciais de Tswett, o Prof. F.M. Schertz, um químico norte-americano resumiu, em 1929, as opiniões de muitos de seus colegas, indicando que “é evidente que Tswett (e, por implicação, seu compatriota Leroy Palmer) nunca, em qualquer momento, trabalhou com pigmentos puros, uma vez que nunca cristalizou as substâncias”⁴.



Figura 1. Edgar Lederer (1908-1988) e Richard Kuhn (1900-1967) em 1931.

Tudo mudou em 1930. Para o primeiro projeto de seu pós-doutorado no laboratório de Prof. Richard Kuhn na Universidade de Heidelberg, o Dr. Edgar Lederer (figura 1) recebeu a tarefa de esclarecer uma controvérsia na área de carotenoides, descrita a seguir.

Quando o Prof. Richard Willstätter e seus colaboradores, da Universidade de Munique e, mais tarde, do Instituto Kaiser-Wilhelm, em Berlim, investigaram os carotenoides de certas plantas, eles identificaram, utilizando o método de cristalização, um hidrocarboneto (caroteno, $C_{40}H_{56}$) e um composto similar contendo dois oxigênios (xantofila, $C_{40}H_{56}O_2$)⁵. Mais tarde, outros colaboradores de Prof. Willstätter encontraram um outro composto com a mesma fórmula química do caroteno, que eles chamaram licopeno⁶. Outros pesquisadores também cristalizaram compostos com fórmulas químicas similares de extratos de outras plantas ou algumas lesmas e deram outros nomes a estes novos compostos. Por outro lado, os trabalhos de Tswett

indicaram que, nas mesmas plantas estudadas pelo grupo de Willstätter, a cromatografia indicou dois carotenos, isto é, dois compostos com posições nos cromatogramas diferentes, mas com espectros muito similares e com a mesma fórmula química do “caroteno” do grupo de Willstätter, e, também, duas xantofilas^{7,8}. O grupo de Willstätter classificou estes resultados como artefatos; de o seu ponto de vista, “o composto” aplicado no topo da coluna isomerizou durante a sua passagem pela coluna⁹. Os químicos que viviam na Europa no início do século 20 acreditavam que as plantas tinham um “caroteno” e uma “xantofila”. Porém, já haviam sido observadas algumas diferenças nos seus espectros, pontos de fusão e atividade ótica.

O interesse em carotenoides foi reforçado pelas observações que eles fizeram a respeito de um importante relacionamento com a vitamina A. Em 1928, foi verificado que a vitamina A se originou do caroteno^{10,11}.

O projeto de Lederer visava resolver as similaridades e as diferenças entre observações de Kuhn e Winterstein, que, utilizando o processo de extração e de cristalização, encontraram similaridades entre a xantofila chamada lutein, extraída do pigmento de gema de ovo, a xantofila extraída de certas folhas e um novo composto, chamada zeaxantina, encontrada em extratos de grão de milho no laboratório de Prof. Paul Karrer em Zurique, utilizando os mesmos procedimentos¹².

Verificando que se tratava de compostos com propriedades muito similares e que a solução deste problema somente poderia ser obtida pela aplicação de um método melhor de “isolamento” dos compostos, Lederer, cuja tese de doutorado estudou as propriedades de alcaloides de índole, buscou na literatura a resposta que procurava. Nesta pesquisa bibliográfica, ele encontrou uma referência ao livro de Palmer¹³ e, no livro, uma referência ao livro e aos trabalhos de Tswett. Discutindo com o Prof. Kuhn este “novo” método de separação descrito por Palmer, ele indicou que, ao que parece, esse método foi inicialmente desenvolvido por Tswett. Neste momento, Kuhn lembrou-se que antes de sair da Universidade de Munique, onde ele passou de assistente (posição equivalente de um professor assistente doutor) do Prof. Willstätter para uma posição de Professor Titular na Universidade de Zurique, o Prof. Willstätter presenteou-o com a sua cópia da tradução para a língua alemã da tese de Tswett. Prof. Kuhn localizou onde ele havia guardado a cópia da tese de Tswett e Lederer baseou seu projeto nos métodos descritos nesta tese.

Tratando de carotenoides, Lederer utilizou uma coluna com 7 mm de diâmetro interno recheada com

carbonato de cálcio e aplicou um extrato de gemas de 100 ovos, eluindo com dissulfeto de carbono. Merece indicar que o primeiro trabalho do grupo de Willstätter com gema de ovos, utilizando extração e cristalização, consumiu 6000 ovos. Lederer encontrou duas bandas bem separadas após um certo período de eluição e tirou-as da coluna, seguindo as instruções de Tswett. Extraíndo cada uma das bandas com metanol, Lederer conseguiu cristalizar duas xantofilas, uma similar à xantofila encontrada nas folhas por Kuhn e Winterstein e outra similar à xantofila do grão de milho descrita pela Prof. Karrer. Em outras palavras, a gema de ovo contém duas diferentes xantofilas, uma similar a xantofila (lutein) encontrada em extratos de folhas e outra (zeaxanthin) similar a encontrada em grão de milho.

Continuando os seus estudos em cromatografia líquido-sólido, Lederer isolou, utilizando uma coluna recheada com alumina “fibrosa” (fabricada pela Merck), dois diferentes carotenos (hoje chamados α -caroteno e β -caroteno) do extrato de cenouras, um com atividade ótica e o outro sem, confirmando que os carotenos isolados pelos grupos de Kuhn e de Karrer foram diferentes. Com uma coluna recheada com carbonato de cálcio, ele isolou dois compostos, um carotenóide (lutein) idêntico ao isolado de gema de ovos e o seu epóxido (taraxantina), de um extrato de dente de leão coletado no jardim do instituto. Estes experimentos, realizados em um período de poucas semanas, resultaram em três artigos publicados no início de 1931¹⁴⁻¹⁶. Em 1933, em razão de ameaças de Hitler, Lederer mudou-se para França e Witterstein, para Suíça. Kuhn permaneceu em Heidelberg e, junto com vários outros colaboradores, continuou os estudos sobre os carotenoides. No período entre 1931 e 1938, o grupo de Heidelberg publicou 52 trabalhos aplicando a cromatografia líquido-sólido. O Prof. Kuhn foi indicado para o Prêmio Nobel de 1938 por seus trabalhos nesta área, mas foi proibido de recebê-lo pelo governo alemão.



Figura 2. Um retrato de Paul Karrer (1889-1971).

Após ler as publicações de Kuhn e Lederer, Prof. Paul Karrer (figura 2) e seus colaboradores na Universidade de Zúrich imediatamente adotaram este novo método de isolamento, aplicando cromatografia em coluna de alumina para purificar a vitamina A extraída de fígados de peixes e elucidando as estruturas dos carotenos e da vitamina A^{17,18}. Este grupo também continuou seus estudos de carotenoides e outras vitaminas, cujos resultados geraram 49 trabalhos aplicando a cromatografia líquido-sólido no período 1931-1938. Em 1937 o Prof. Karrer recebeu o Prêmio Nobel por suas pesquisas sobre os carotenoides e as vitaminas A e C.

Um outro pesquisador na área de carotenoides, o Prof. László Zechmeister da Universidade de Pécs (figura 3), na Hungria, também aplicou a cromatografia líquido-sólido após ler os trabalhos de grupo de Heidelberg. Os interesses do Prof. Zechmeister focalizaram nos componentes encontrados na pimenta-doce vermelha da Hungria e ele utilizou colunas recheadas com uma mistura de carbonato de cálcio e o hidróxido de cálcio para realizar as suas separações (figura 4)¹⁹. Um livro sobre carotenoides, publicado em 1932, já continha um capítulo sobre a utilização de cromatografia para a separação de pigmentos²⁰. Sua contribuição mais importante foi um livro, cuja primeira edição foi em 1937, sobre o método cromatográfico, que ele escreveu junto com seu mais importante colaborador, László Cholnoky²¹. Este livro foi um sucesso absoluto e sua segunda edição foi publicada em 1938²², confirmando a cromatografia como uma das ferramentas mais importantes para os químicos orgânicos europeus e mundiais.

Nessa década, os aparelhos utilizados por todos os grupos europeus não diferiam muito dos sistemas de Tswett: tubos de vidro de 15 a 80 cm de comprimento com diâmetros de 1 a 3 cm para

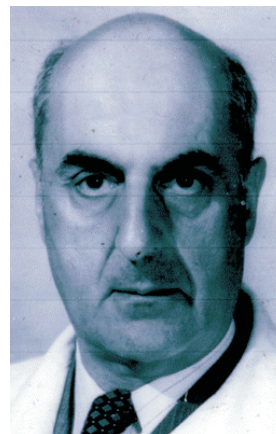


Figura 3. Uma foto de László Zechmeister (1889-1972).

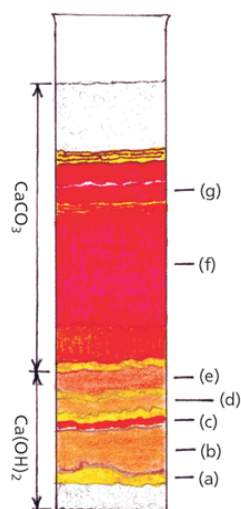


Figura 4. Cromatograma dos pigmentos encontrados na pele de pimenta-doce vermelha da Hungria. A parte superior da coluna contém CaCO_3 e a parte inferior Ca(OH)_2 . A fase móvel foi éter de petróleo (fração de ponto de ebulição de 60-80 °C). Bandas: (a) α -caroteno; (b) β -caroteno; (c) γ -caroteno; (d) ester de criptoxanteno; (e) ester de zeaxantina; (f) ester de captanina; (g) ester de capsorutina.

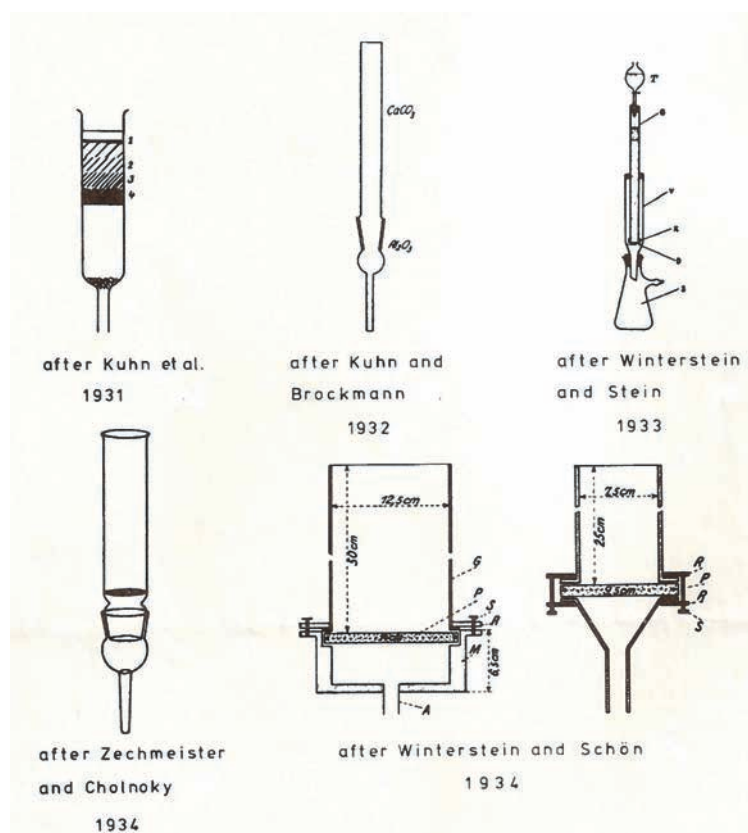


Figura 5. Diagramas de algumas das colunas utilizadas na década de 1930 [27].

separações em escala menor e até 10 cm de diâmetro para algumas separações preparativas (figura 5). O uso de pressão ou vácuo, como descrito por Tswett, também ajudou as separações. Como Tswett, eles realizaram a eluição somente até o ponto que sugeriu que todos os componentes foram separados e, depois, removeram a fase estacionária da coluna para extrair as bandas individuais com um solvente apropriado para espectrometria ou cristalização. Para os compostos coloridos, as bandas separadas foram identificadas visualmente. Quando havia suspeitado da presença de compostos incolores, as bandas eram reveladas por suas fluorescências, utilizando tubos de quartzo^{23,24}. No meio da década de 1930, alguns pesquisadores iniciaram o processo de eluição completa^{25,26}, mas o uso de um detector no final da coluna somente foi descrito alguns anos mais tarde.

Como resultado da explosão de aplicações de cromatografia, em 1939, somente dez anos após a crítica de Schertz sobre as supostas deficiências do método de Tswett, o Prof. Karrer indicou que “é um erro pensar que uma preparação purificada por cristalização é mais pura que uma obtida por análise cromatográfica. Em todas as investigações recentes, a purificação por cromatografia é considerada muito

superior à purificação por cristalização”²⁷. Ele continuou, indicando que “nenhuma outra descoberta tem influenciado e ampliado o campo de química orgânica tanto como as análises cromatográficas por adsorção, desenvolvidas por Tswett”. De fato, desde o início da década de 1930, a maioria das purificações, bem como outras separações em escalas diversas, foram feitas por cromatografia líquido-sólido e muitas continuam usando esta técnica até a presente data.

Referências Bibliográficas

1. C.H. Collins, *Sci. Chromatogr. (São Carlos)*, **2009**, 1 n° 1, 7-20.
2. M. Tswett, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **1906**, 24, 316.
3. M. Tswett, M., *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **1906**, 24, 384.
4. F.M. Schertz, *Plant Physiol.* **1929**, 4 337.
5. R. Willstätter, W. Meig, *Ann. Chem.* **1907**, 355, 1.
6. R. Willstätter, H.H. Escher, *Z. Physiol. Chem.* **1912**, 76, 214
7. M. Tswett, “Khromofilly v Rastitel’ nom – Zhivotnom Mire (Chromophylls in the Plant and Animal World)” Karbasnikov Publishers, Warsaw, 1910.
8. M. Tswett, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **1911**, 29, 630.

9. R. Willstätter, A. Stoll, "Untersuchungen über Chlorophyll: Methoden und Ergebnisse", Springer-Verlag, Berlin, 1913.
10. B. von Euler, H. von Euler, H. Hellström, *Biochem. Z.*, **1928**, 203, 370.
11. T. Moore, *Biochem. J.*, **1930**, 24, 692.
12. P. Karrer, J. Salomon, H. Wehrli, *Helv. Chim. Acta*, **1929**, 12, 790.
13. L.S. Palmer, "Carotenoids and Related Pigments. The Chromolipids", Chemical Catalog Co., New York, 1922.
14. R. Kuhn, E. Lederer, *Naturwissenschaften*, **1931**, 19, 306.
15. R. Kuhn, A. Winterstein, E. Lederer, *Z. Physiol. Chem.* **1931**, 197, 141.
16. R. Kuhn, E. Lederer, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1931**, 64, 1349.
17. P. Karrer, R. Morf, K. Schöpp, *Helv. Chim. Acta*, **1931**, 14, 1036.
18. P. Karrer, K. Schöpp, R. Morf, *Helv. Chim. Acta*, **1931**, 15, 1158.
19. L. Zechmeister, L. Cholnoky, *Ann. Chem.*, **1934**, 509, 269.
20. L. Zechmeister, em "Handbuch der Pflanzenanalyse", G. Klein, Ed., vol. 3, Springer Verlag, Vienna, 1932.
21. L. Zechmeister, L. Cholnoky, "Die Chromatographische Adsorptionmethode", Springer Verlag, Vienna, 1937.
22. L. Zechmeister, L. Cholnoky, "Die Chromatographische Adsorptionmethode", 2^a ed., Springer Verlag, Vienna, 1938.
23. A. Winterstein, K. Schön, *Z. Physiol. Chem.* **1934**, 230, 139.
24. P. Karrer, K. Schöpp, *Helv. Chim. Acta*, **1934**, 17, 693.
25. H.N. Holmes, H. Cassidy, R.S. Manly, E.R. Hartzler, *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 1990.
26. W. Koschura, *Z. Physiol. Chem.* **1936**, 239, 89.
27. P. Karrer, *Helv. Chim. Acta*, **1939**, 22, 1149.
28. E. Geeraert, M. Verzele, *Chromatographia*, **1978**, 11, 642.