

III. Os primórdios da cromatografia líquido-líquido



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” apresenta o desenvolvimento da cromatografia líquido-líquido em coluna, descrito em um breve trabalho publicado de dez páginas que, além de relatar pela primeira vez o uso de uma fase estacionária líquida para a separação de monoaminoácidos, também propõe o conceito de altura de pratos para avaliar a eficiência da separação, conseguindo o Prêmio Nobel de 1952 para os seus autores, A. J. P. Martin e R. L. M. Synge.

Palavras-chave

História de cromatografia,
Cromatografia líquida-líquida,
Cromatografia em coluna,
Aminoácidos

Abstract

This chapter of “Pillars of Chromatography” presents the development of liquid-liquid column chromatography, described in a brief publication that, in addition to relating the first use of a liquid stationary phase for the separation of monoamino-acids also proposed the concept of the height of a theoretical plate to evaluate the efficiency of a separation. This ten page publication resulted in the Nobel Prize for 1952 for its authors, A. J. P. Martin and R. L. M. Synge.

Keywords

History of chromatography,
Liquid-liquid chromatography,
Column chromatography,
Amino-acids

A partir do início da década de 1930, a cromatografia líquido-sólido, aplicando a técnica descrita por Tswett em 1906¹, começou ser uma das técnicas principais utilizadas pelos químicos orgânicos e por outros cientistas para a separação de misturas de complexidade elevada. Por outro lado, a extração líquido-líquido também era considerada muito importante quando uma determinada separação era realizada pela diferença de solubilidade dos compostos em estudo.

Com o objetivo de aplicar um processo de extração líquido-líquido contínuo para separar os aminoácidos encontrados após a hidrólise das proteínas e peptídeos extraídos de lã, dois jovens bioquímicos, A.J.P. Martin e R.L.M. Synge, ambos graduados da Universidade de Cambridge (Grã-Bretanha), iniciaram uma colaboração que resultou no Prêmio Nobel de 1952.

Archer John Porter Martin (1910-2002) sempre se interessou pela construção de equipamentos. Quando ainda estava no colégio, ele construiu uma coluna para destilação fracionária com uma série de latas soldadas e avaliou o seu comportamento. Martin iniciou seus estudos na Universidade de Cambridge, em Engenharia Química, mas se transferiu para Bioquímica, devido à influência de um de seus professores. Obteve seu bacharelado da Universidade de Cambridge em 1932, em Bioquímica, e iniciou os estudos para obter o seu doutorado sobre a vitamina E no Laboratório Dunn de Nutrição desta universidade. Para realizar as separações necessárias, ele construiu um sistema de extração líquido-líquido em contracorrente, com dois líquidos passando em direções opostas, através de 45 tubos de vidro, cada com 2,5 m de comprimento, conectados entre si por um *manifold*. Cada separação requereu uma semana para ser realizada, mas forneceu bons resultados, de forma que o seu sistema ficou famoso entre os pesquisadores da universidade.

Richard Lawrence Millington Synge (1914-1994) também estudou Bioquímica na Universidade de Cambridge, obtendo seu bacharelado em 1936. Após a graduação, ele recebeu uma bolsa de doutorado do *International Wool Secretariat* para um projeto que visava desenvolver um método para separar e determinar os aminoácidos encontrados em lã. A sua primeira etapa, após a hidrólise de um extrato da lã, foi acetilar os grupos carboxílicos e medir os seus coeficientes de partição, verificando que as extrações usando água e clorofórmio apresentaram as melhores eficiências para serem aplicadas em uma série de etapas da extração líquido-líquido para efetuar a separação. Enfrentando problemas com um processo envolvendo inúmeras etapas, alguém sugeriu a Synge

que ele deveria falar com Martin sobre seu equipamento para extrações contínuas, o que foi acatado. Martin se interessou pelo projeto e começou construindo um outro equipamento, sendo que o primeiro não funcionou com água-clorofórmio. Enquanto este aparelho estava sendo montado, Martin e Synge transferiram de Cambridge para a cidade de Leeds, nos laboratórios da Associação para Pesquisas das Indústrias de Lã (*Wool Industries Research Association Laboratories*). O novo equipamento era tão complicado quanto o primeiro e requeria vários dias para as separações e a presença constante de um membro da equipe. Isto constituía em um grande problema, pois havia vazamentos nas múltiplas conexões do equipamento e os vapores de clorofórmio preenchiam o ambiente, sem ventilação apropriada, dificultando que o membro da equipe ficasse acordado. O aparelho, projetado por Martin para ter 40 pratos, funcionou, permitindo a separação e identificação de alguns aminoácidos monocarboxílicos e os resultados preliminares foram devidamente publicados². Entretanto, o sistema era complexo e os dados requeriam um tempo longo para serem adquiridos. Para o projeto ter sucesso, uma outra técnica foi necessária.

A próxima tentativa foi colocar fibras longas de algodão e de lã em um tubo e passar através destas fibras dois solventes em direções opostas, clorofórmio de cima para baixo e água de baixo para cima. Martin supunha que os aminoácidos pudessem ser distribuídos diferencialmente entre os dois solventes e as fibras. Porém, o sistema não deu os resultados esperados devido aos problemas nos diversos equilíbrios necessários com dois líquidos em movimento simultâneo.

Após a devida reconsideração do conceito, Martin decidiu que não seria necessário ter ambos os líquidos em movimento. Um líquido poderia permanecer fixo. Em poucos dias, o primeiro sistema para a “cromatografia líquido-líquido” foi construído e testado. Uma solução aquosa do indicador, alaranjada de metila (que servia para indicar a passagem dos componentes da amostra através da coluna), foi adsorvida em partículas de sílica gel (tirada do estoque de agente dessecante do laboratório), que foram transferidas para um tubo de vidro de 20 cm de comprimento e um cm de diâmetro interno. Após deslocar a água residual da coluna com clorofórmio contendo um pouco de álcool, adicionado pela fabricante como estabilizador do clorofórmio, uma amostra de dois aminoácidos acetilados foi colocada no topo da coluna. A eluição foi realizada com a mesma fase móvel, e a passagem dos componentes da amostra foi mostrada pelo

indicador, permitindo a coleção dos aminoácidos separados na saída da coluna. Os primeiros resultados descrevendo a separação da acetilprolina e da acetilileucina foram apresentados na Reunião Anual da Sociedade de Bioquímica, em junho de 1941. Após um número significativo de experimentos para aperfeiçoar o método e aplicá-lo a outros aminoácidos, os resultados foram submetidos à publicação no *Biochemical Journal*, no dia 10 de novembro de 1941. O trabalho foi publicado no número de dezembro desta revista³.

O trabalho, intitulado “A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins” (“Uma nova forma de cromatograma empregando duas fases líquidas. 1. Uma teoria de cromatografia. 2. Aplicação para a micro-determinação dos monoaminoácidos de proteínas”) (Figura 1), apresentou aspectos teóricos da cromatografia, incluindo a sugestão que o conceito de “altura equivalente de um prato teórico” (HETP), bem difundida para uso em destilação fracionária⁴, poderia ser aplicado também para as cromatografias em coluna, e descreveu a aplicação de seu novo tipo de cromatografia, a cromatografia líquido-líquido, a diversos monoaminoácidos, não somente os dois descritos na apresentação feita em junho.

151. A NEW FORM OF CHROMATOGRAM EMPLOYING TWO LIQUID PHASES

1. A THEORY OF CHROMATOGRAPHY
2. APPLICATION TO THE MICRO-DETERMINATION OF THE HIGHER MONOAMINO-ACIDS IN PROTEINS

By A. J. P. MARTIN AND R. L. M. SYNGE

From the Wool Industries Research Association, Torridon, Headingley, Leeds

(Received 19 November 1941)

Figura 1. Título do trabalho de Martin e Synge publicado no *Biochemical Journal* em dezembro de 1941.

É importante ressaltar aqui que os autores imediatamente reconheceram que o novo método de separação tratava de um processo de cromatografia. Em sua autobiografia, Martin descreveu que tinha assistido uma demonstração sobre cromatografia líquido-sólido apresentada por Winterstein, colaborador de Richard Kuhn (ver Capítulo 2⁵), em 1933. Sendo assim, quando os dois pesquisadores começaram a utilizar uma coluna recheada, eles

deduziram que estavam fazendo “cromatografia”. Martin também lembrou que ele iniciou seus pensamentos sobre a relação entre a eficiência em uma separação cromatográfica e em destilação após assistir a demonstração de Winterstein.

Mesmo com deficiências, por não considerar as diferenças entre um sistema em equilíbrio completo, como cada etapa em destilação fracionária, e o processo cromatográfico no qual sempre existe uma fase em movimento, introduzindo um aspecto cinético, a teoria apresentada no trabalho de Martin e Synge foi imediatamente aplicada por outros pesquisadores. O cálculo da altura de prato era fácil e permitia comparações entre os diversos sistemas de separação, lembrando que, nesta época, os cromatogramas eram feitos a mão, baseados no conteúdo de cada pico coletado.

Os dois pesquisadores continuaram seus estudos e enfrentaram um novo problema: uma coluna utilizando sílica como suporte não poderia ser empregada para a separação dos aminoácidos com dois grupos carboxílicos. Estes compostos eram retidos irreversivelmente. Após uma série de tentativas, fitas de papel de filtro (celulose) para apoiar a fase estacionária aquosa foram colocadas na coluna e comprovaram ter utilidade.

Nesta época, Synge defendeu seu doutorado. Ele saiu do laboratório em Leeds, em 1943, indo inicialmente para o Instituto Lister de Medicina Preventiva em Londres. Depois, fez um pós-doutorado com Prof. Arne Tiselius na Suécia e, ao retornar a Grã-Bretanha, trabalhou no Instituto de Pesquisas Rowett em Aberdeen e depois no Instituto para Pesquisas em Alimentos em Norwich.

Martin continuou em Leeds por mais alguns anos, aprimorando o conceito de “cromatografia por partição”, um nome não utilizado no trabalho inicial de 1941, mas que foi empregado em suas publicações subsequentes. Ele, com outros colaboradores, aplicaram a cromatografia por partição no desenvolvimento da cromatografia em papel e, já em Londres, no Instituto Nacional para Pesquisas Mediciniais do Conselho Britânico de Medicina, estendeu seus estudos sobre cromatografia por partição para o desenvolvimento de cromatografia gás-líquido.

Entretanto, o Prêmio Nobel que reconheceu Martin e Synge, em 1952 (Figuras 2 e 3), pelo desenvolvimento da cromatografia por partição, foi baseado somente no trabalho de dez páginas publicado em 1941, que apresentou à comunidade de químicos e bioquímicos o conceito, a teoria e a prática desta nova forma da cromatografia.



Figura 2. A.P.J. Martin recebendo o Prêmio Nobel do Rei Gustavo VI Adolphus da Suécia em 1952.

Referências Bibliográficas

1. C.H. Collins, *Sci. Chromatogr.*, **2009**, *1*, 1-21.
2. A.P.J. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.*, **1941**, *35*, 91-121.
3. A.P.J. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.*, **1941**, *35*, 1358-1368.
4. W.A. Peters, Jr., *Ind. Eng. Chem.*, **1922**, *14*, 376.
5. C.H. Collins, *Sci. Chromatogr.*, **2009**, *1*, no. 2, 7-11.



Figura 3. R.L.M. Synge recebendo o Prêmio Nobel do Rei Gustavo VI Adolphus da Suécia em 1952.