

IV. O Desenvolvimento da Cromatografia em Papel



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 diversos desenvolvimentos e aplicações da cromatografia em papel, empregando o mecanismo de partição, com importantes contribuições do A. J. P. Martin. Alguns fatos antecedentes da cromatografia em papel também são descritos.

Abstract

This chapter of “Pillars of Chromatography” describes the diverse developments and applications of paper chromatography, which employs the partition mechanism, with important contributions from A.J.P. Martin. Some antecedents of paper chromatography are also described.

Palavras-chave

História da cromatografia;
Cromatografia em papel;
Cromatografia líquido-líquido;
Cromatografia por partição.

Keywords

History of chromatography;
Paper chromatography;
Liquid-liquid chromatography;
Partition chromatography.

Após tentativas frustradas de separação dos aminoácidos encontrados após a hidrólise de lã usando um sistema de extração líquido-líquido, A. J. P. Martin e R. L. M. Synge conseguiram separar e identificar os monoaminoácidos, utilizando a cromatografia líquido-líquido¹. Nesta técnica, a coluna empregada continha sílica gel como suporte da água, que exerceu a função de fase estacionária, e o clorofórmio foi utilizado como fase móvel. No seu importante trabalho de 1941², além de descrever este

novo tipo de cromatografia líquida em coluna, os autores também aplicaram a teoria de pratos para indicar a eficiência da separação.

Os dois pesquisadores continuaram seus estudos e enfrentaram um novo problema: uma coluna utilizando sílica como suporte não poderia ser empregada para separar aminoácidos com dois grupos carboxílicos. Estes compostos permaneceram retidos irreversivelmente na coluna. Após uma série de tentativas, fitas de papel de filtro (celulose), para

apoiar a fase estacionária aquosa, foram colocadas na coluna e mostravam-se úteis para esta difícil separação, porém resultaram em baixa eficiência. Martin pensou que, talvez, o papel poderia funcionar de uma forma diferente, se a amostra fosse aplicada diretamente no papel úmido e depois passasse a fase móvel através do papel.

Neste época, Synge defendeu sua tese de doutorado e saiu dos laboratórios da Associação para Pesquisas das Indústrias de Lã, em Leeds. O projeto de aplicar a amostra diretamente no papel foi realizado por dois novos colaboradores de Martin, A. H. Gordon e R. Consden. Os resultados deste projeto foram publicados, em 1944 (Figura 1), com o título “*Qualitative Analysis of Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper*” (“Análise Qualitativa de Proteínas: um Método de Cromatografia por Partição Utilizando Papel”)³.

Por outro lado, esta não foi a primeira publicação sobre cromatografia em papel. No século dezanove, um químico industrial, Friedlieb Ferdinand Runge (1794-1867), utilizou papel de filtro para verificar a pureza dos corantes. Runge ficou fascinado com as distribuições de cores obtidas quando ele

colocou uma ou mais substâncias no centro do papel e gotejou soluções aquosas sobre a mancha. Após a sua aposentaria da indústria, ele dedicou-se a separar de várias misturas de compostos colocados no papel, que foi molhado com soluções ácidas ou básicas, obtendo vários desenhos (Figura 2). Runge publicou vários trabalhos e dois livros^{4,5} descrevendo e mostrando seus desenhos, mas não apresentou nenhum mecanismo para explicar o fenômeno estudado.

Em 1861, Christian Friedrich Schoenbein (1799-1868) e seu aluno/colaborador, Friedrich Goppelsroeder (1837-1919), iniciaram estudos com tiras de papel que eles colocaram em frascos contendo diversas soluções^{6,7}. O solvente subiu nas tiras e os componentes da solução migraram também, com velocidades diferentes, como indica a Figura 3, apresentada no livro de Goppelsroeder⁸. Estes pesquisadores descreveram o processo como envolvendo ação capilar, da mesma maneira que a seiva sobe em um árvore. É necessário indicar que todos os experimentos foram feitos pelo processo hoje chamado análise frontal, sempre aplicando a solução de solvente com seus componentes e nunca pelo processo de eluição.

Qualitative Analysis of Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper

By R. CONSDEN, A. H. GORDON AND A. J. P. MARTIN, *Wool Industries Research Association, Torridon, Headingley, Leeds, 6*

(Received 13 May 1944)

Figura 1. Título do primeiro trabalho do A.J.P. Martin e colaboradores sobre cromatografia em papel.

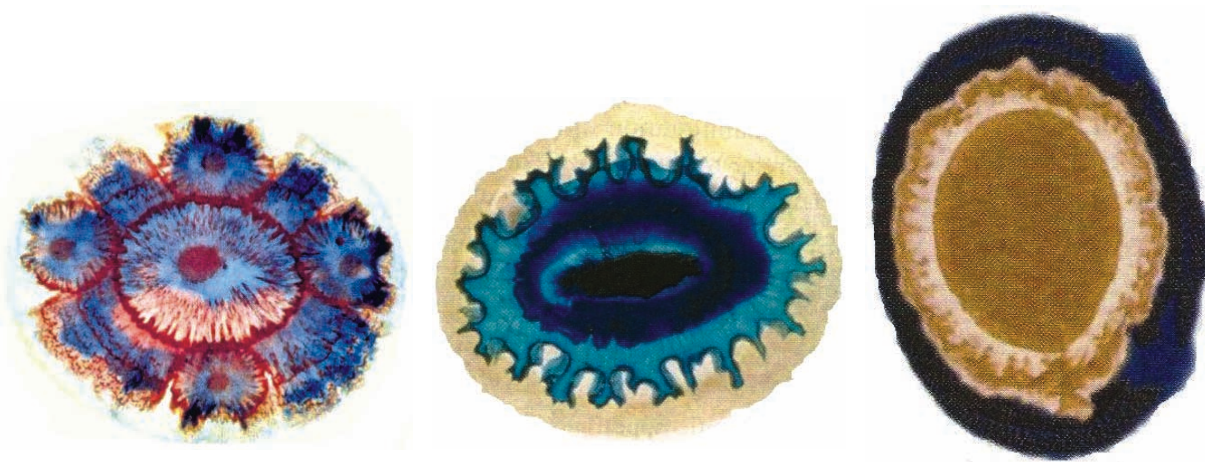


Figura 2. Alguns desenhos de F.F. Runge utilizando papel de filtro. (A) Soluções de CuSO_4 e $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ aplicados no papel e desenvolvidos com uma solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; (B) MnSO_4 e FeSO_4 aplicados no papel e desenvolvidos com uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; (C) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ aplicado no papel e desenvolvidos com uma solução de CuSO_4 .

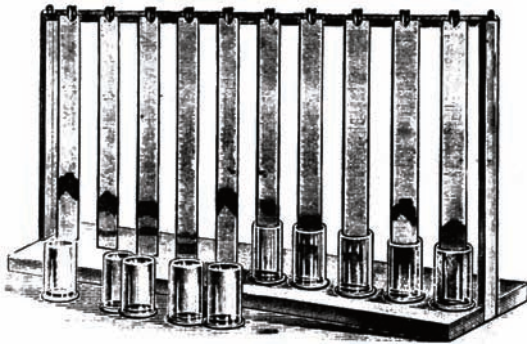


Figura 3. Sistema de cromatografia em papel ascendente de Goppelshroder.

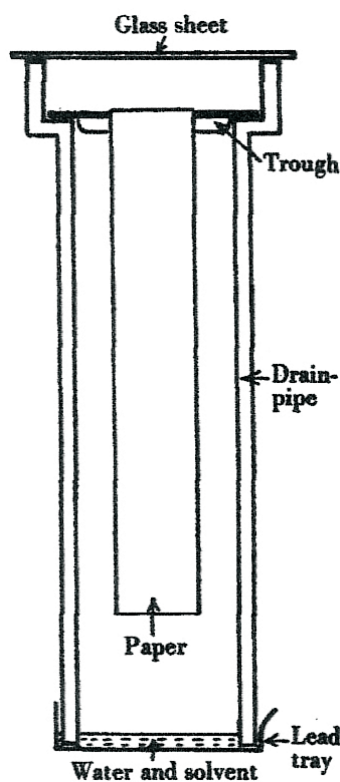


Figura 4. Cuba para desenvolvimento descendente de Martin e colaboradores¹.

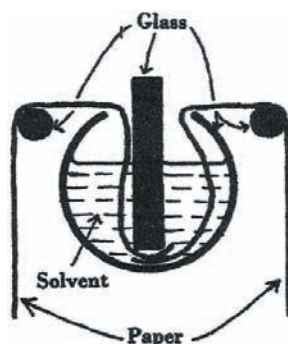


Figura 5. Detalhe do recipiente para contato do papel molhado com água com a fase móvel de Martin e colaboradores³.

Na década de quarenta do século vinte, o mecanismo de ação capilar para explicar a subida do solvente e seus componentes ainda foi utilizado por Raphael Edward Liesegang (1909-1947), que publicou dois trabalhos^{9,10} descrevendo o uso de papel de filtro para separações, realizadas por eluição ascendente em um ambiente fechado, após a aplicação à tira de papel de uma mancha, contendo os analitos. Ele também descreveu o desenvolvimento em duas dimensões, usando duas diferentes fases móveis, um processo que ele chamou “*kreuzkapillar analyse*” (análise capilar cruzada). Uma vez que estes trabalhos foram publicados em uma revista alemã durante a segunda guerra mundial, os seus conteúdos não foram conhecidos por Martin e seus colaboradores antes das suas publicações.

Em Leeds, a primeira tarefa dos novos colaboradores de Martin foi desenvolver um processo de detecção. Na coluna de cromatografia líquido-líquido, Martin e Synge utilizaram um indicador para acusar a passagem dos ácidos, permitindo coletar o eluente para futuros testes. No papel, o indicador não deu resultados satisfatórios; precisaria de uma reação posterior à separação. Uma pesquisa bibliográfica sugeriu o uso de ninidrina, que reage com grupos aminos para produzir cores de verde a violeta, facilmente visíveis. Nas primeiras separações utilizaram butanol como fase móvel, mas em experimentos posteriores utilizaram diversas fases móveis, sendo que as descritas no seu primeiro trabalho³, além do butanol, foram fenol, *o*-cresol, 2,4,5-trimetilpiridina (colodina), álcool tert-amil, álcool benzílico e ácido tert-butírico.

O trabalho de Martin e colaboradores³ descreveu em detalhes o sistema fechado empregado no desenvolvimento por eluição descendente (Figuras 4 e 5). Além de muitos resultados sobre as separações de diversos aminoácidos, utilizando várias fases móveis, o trabalho apresentou a descrição do desenvolvimento em duas dimensões (Figura 6) e propôs um método para prever uma separação em duas dimensões, graficando as distâncias de corrida observadas nas duas fases separadamente (Figura 7). Também foi proposto um termo (R_F , a razão entre a distância percorrida pela substância e a percorrida pela fase móvel, ambas da linha de aplicação da amostra), ainda utilizado hoje, que permitiu comparações entre os cromatogramas. Mas, a contribuição mais importante deste trabalho de Martin e colaboradores³ foi definir o mecanismo das separações em cromatografia em papel como de partição, a distribuição dos componentes entre dois líquidos, um sendo suportado por um sólido estacionário e o outro em movimento contínuo.



Figura 6. Cromatograma em duas dimensões do trabalho de Martin e colaboradores³.

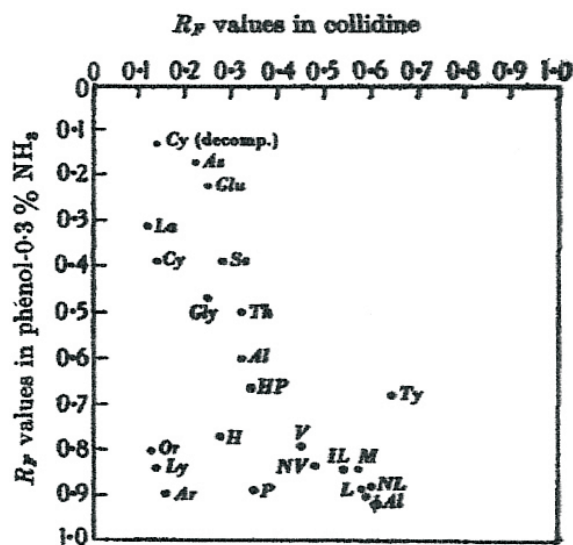


Figura 7. Gráfico proposto por Martin e colaboradores³, ilustrando como prever as separações em duas dimensões.

Referências Bibliográficas

1. C.H. Collins, Sci. Chromatogr. (São Carlos), 1, no. 3, 7-10 (2009).
2. A.P.J. Martin, R.L.M. Synge, Biochem. J., 35, 1358-1368 (1941).
3. R.Consden, A.H. Gordon, A.P.J. Martin, Biochem. J., 38, 224-232 (1944).
4. F.F. Runge, "Zur Farben-Chemie. Musterbildung für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Zeichner, Maler, Verzierer und Zeugdrucker. Dargestellt durch chemische Wechselwirkung", E. S. Mittler & Sohn, Berlin, 1850.
5. F.F. Runge, "Der Bildungstrieb der Stoffe, veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern (Fortsetzung der Musterbilder)", publicado pelo autor, Oranienburg, Alemanha, 1855.
6. C.F. Schoenbein, Verb.Naturforsch. Ges. Basel, 3, 249-255 (1861).
7. F. Goppelsroeder, Verb.Naturforsch. Ges. Basel, 3, 268-275 (1861).
8. F. Goppelsroeder, "Capillaranalyse beruhendvau Capillaritäts- und Adsorptionserscheinungen", Emil Birkhäuser Verlag, Basel, 1901.
9. R.E. Liesegang, Z. Anal Chem. 126, 172-177 (1943).
10. R.E. Liesegang, Z. Anal Chem. 126, 334-336 (1943).