

Artigo

História da Cromatografia Líquida**Pacheco, S.*; Borguini, R. G.; Santiago, M. C. P. A.; Nascimento, L. S. M.;
Godoy, R. L. O.***Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (4), 1225-1271. Data de publicação na Web: 2 de abril de 2014<http://www.uff.br/rvq>**History of Liquid Chromatography**

Abstract: It is common sense among historians of science to credit the merit of the invention of liquid chromatography to the Russian botanist M. S. Tswett. The landmark is a report published by him in 1903 about the newly invented technique. However, there are many records related to chromatography prior to Tswett. There are records of experiments dating to the year 77 in ancient Rome. The history of liquid chromatography has interesting discoveries and inventions as well as disputes between groups of researchers who in one way or another helped it to become one of the most widely used analytical techniques today. Reading the history of liquid chromatography is an interesting way to learn about the technique and to discover how creative solutions to the analytical challenges of each era were designed. Most described experiments and techniques developed are still used nowadays. The construction of the first chromatography system is also described in detail. It was constructed almost entirely with pieces commercially available and was able of separating, derivatize and detect a complex mixture of amino acids and peptides. Its use led the builders to the Nobel Prize in chemistry.

Keywords: High Performance Liquid Chromatography; HPLC; Tswett.

Resumo

É senso comum, entre os historiadores da ciência, creditar o mérito da invenção da cromatografia líquida ao botânico russo M. S. Tswett, tendo como marco um relatório por ele publicado em 1903 acerca da técnica recém-inventada. No entanto, são muitos os registros de fenômenos, anteriores a Tswett, relacionados à cromatografia. Existem registros de experimentos datados do ano de 77, na Roma antiga. A história da cromatografia líquida ainda guarda interessantes descobertas e invenções bem como disputas entre grupos de pesquisadores que de uma forma ou de outra contribuíram para que ela se tornasse uma das técnicas analíticas mais utilizadas hoje no mundo. A leitura da história da cromatografia líquida é uma interessante maneira de se aprender sobre a técnica e descobrir como foram concebidas soluções criativas para os desafios analíticos de cada época. A maior parte dos experimentos descritos e técnicas desenvolvidas são utilizadas até os dias de hoje. A construção do primeiro sistema cromatográfico também é descrito com detalhes. Ele foi construído quase que totalmente com peças comercialmente disponíveis e foi capaz de separar, derivatizar e detectar uma mistura complexa de aminoácidos e peptídeos. A utilização desse sistema levou seus construtores ao prêmio Nobel de química.

Palavras-chave: Cromatografia Líquida; CLAE; Tswett.

* Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Cromatografia Líquida, Avenida das Américas, 29501, CEP 23020-470, Guaratiba, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ sidney.pacheco@embrapa.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150069](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150069)

História da Cromatografia Líquida

**Sidney Pacheco,* Renata G. Borguini, Manuela Cristina P. A. Santiago,
Luzimar S. M. do Nascimento, Ronoel Luiz O. Godoy**

Embrapa Agroindústria de Alimentos, Laboratório de Cromatografia Líquida, Avenida das Américas, 29501, CEP 23020-470, Guaratiba, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* sidney.pacheco@embrapa.br

Recebido em 9 de setembro de 2014. Aceito para publicação em 26 de março de 2015

- 1. Primeiros relatos de fenômenos relacionados à cromatografia**
- 2. As imagens autoformadas de Runge**
 - 2.1. Biografia de Friedlieb Ferdinand Runge
 - 2.2. Os livros de Runge
- 3. A contribuição de Schönbein**
- 4. A contribuição de Goppelsroeder**
- 5. A invenção da cromatografia**
 - 5.1. Biografia de Mikhail Semenovich Tswett
 - 5.2. Relatório preliminar de Tswett publicado em 1903
 - 5.3. As publicações de 1906
 - 5.4. O aparato cromatográfico de Tswett
 - 5.5. As publicações de 1910 e 1911
 - 5.6. Considerações sobre os experimentos de Tswett
- 6. Utilização e evolução da cromatografia nos anos pós Tswett**
 - 6.1. A contribuição de Charles Dhéré
 - 6.2. A contribuição de Leroy Sheldon Palmer
 - 6.3. A redescoberta da cromatografia de Tswett
- 7. A cromatografia líquida em camada delgada**
- 8. A cromatografia em fase gasosa**
- 9. A contribuição de Tiselius e Claesson**
 - 9.1. A cromatografia de deslocamento
 - 9.2. Encontro para discussão de análises cromatográficas: *The Faraday Society*
- 10. A contribuição de Moore e Stein**
 - 10.1. Biografias de Stanford Moore e Willian H. Stein

- 10.2. A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de amido
- 11. A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de troca iônica
 - 11.1. A contribuição de Partridge
 - 11.2. Moore e Stein adotam as colunas de resinas de troca iônica
 - 11.3. Aplicações analíticas da cromatografia em colunas de troca iônica
- 12. O cromatógrafo de Moore e Stein
 - 12.1. Sistemas de bombeamento
 - 12.2. Reservatórios para as fases móveis
 - 12.3. Sistema de deaeração de fases móveis
 - 12.4. Colunas cromatográficas
 - 12.5. Reator para derivatização com ninidrina
 - 12.6. Fotômetro para detecção em linha
 - 12.7. Registrador automático
- 13. Resumo sobre as contribuições de Stein e Moore para a cromatografia líquida
- 14. “Cromatograma” do tempo (a história da cromatografia)
- 15. A instrumentação comercial
- 16. A evolução das fases estacionárias para cromatografia líquida
 - 16.1. Colunas com partículas superficialmente porosas (*coreshell*)
 - 16.2. Colunas monolíticas
 - 16.3. Coluna de fase reversa C₃₀
 - 16.4. Colunas com partículas inferiores a 2µm

1. Primeiros relatos de fenômenos relacionados à cromatografia

É senso comum entre os historiadores da ciência, creditar o mérito da invenção da cromatografia ao botânico russo M. S. Tswett, tendo como marco um relatório publicado em 1903. No entanto, são muitos os registros de fenômenos relacionados à cromatografia anteriores a Tswett. Provavelmente, a primeira observação de utilização destes fenômenos seja do historiador romano Caio Plínio Segundo (23-79) no ano de 77 da nossa era. Conhecido como Plínio, o Velho, era um militar romano naturalista, que devido a sua dedicação ao entendimento dos fenômenos naturais, acabou falecendo ao ser atingido por gases tóxicos quando tentou observar a erupção do vulcão Vesúvio, no ano 79, em Pompéia.

Entre os anos de 77 e 79, Plínio publicou uma grande obra chamada História Natural (“*Naturalis Historia*”), uma grande enciclopédia (trinta e sete livros). No capítulo 26 do livro de número 34, Plínio descreve um método para verificar a autenticidade de *verdigris*, um sal fabricado na reação do metal cobre com ácido acético, que desde a antiguidade foi usado como fungicida e pigmento verde. Na época, uma fraude comum era a adição de pó de mármore verde ao *verdigris* para aumentar o seu rendimento. Plínio descreveu um método que consistia na aplicação do produto em folhas de papiro embebidas com um extrato vegetal. No caso de autenticidade, o papiro tornava-se imediatamente negro.¹

Outro relato de um fenômeno cromatográfico apareceu 1700 anos depois de Plínio, o autor foi Jöns Jacob Berzelius (1779–1848). Berzelius é mais conhecido como um dos fundadores da química

moderna. Berzelius formou-se em medicina em 1800, quando publicou um estudo sobre a composição salina das águas do *spa* Medevi na Suécia, famoso por suas águas e lamas medicinais, e que funciona até hoje. Berzelius seguiu sua carreira científica estudando o preparo de águas minerais artificiais, muito utilizadas na época para tratamento de inúmeras enfermidades.² Em seus estudos com a água, Berzelius observou e descreveu o fenômeno da desmineralização da água salgada por meio de filtração através de areia.

Em 1844, o físico e neurofisiologista italiano Carlo Matteucci (1811-1868) foi convidado pelo governo da Toscana para ministrar um curso sobre fenômenos físicos dos seres vivos na Universidade de Pisa. Em 1847, Matteucci publicou o livro “palestras sobre os fenômenos físicos de seres vivos”. Em suas observações empíricas, Matteucci reproduziu o experimento de Berzelius, em que água salgada é transformada em “fresca” por filtração. Uma solução salina foi filtrada através de um tubo de 8 metros contendo areia. A água que saía do tubo era menos densa que a inserida no topo. No entanto, a diferença de densidade não era mantida e, depois de certo tempo, a solução de saída tornava-se tão densa quanto à de entrada.³ Matteucci buscava explicação para a existência de fontes de água doce a partir de água do mar percolada através do solo. Na mesma publicação, Matteucci ainda relatou o interessante fenômeno que ocorre quando gotas de chocolate ou tinta caíam sobre a roupa ou papel de filtro, formando um ponto central escuro circundado por uma zona de

líquido claro colorido. Efeito semelhante foi por ele observado, quando o sangue extravasava o tecido celular subcutâneo, deslocando o plasma para as margens separando-o do material colorido.³

2. As imagens autoformadas de Runge

Encontra-se na biblioteca Beinecke de livros e manuscritos raros da Universidade de Yale, um livro de grande interesse para a história da cromatografia, mas que curiosamente é mais consultado por curiosos e historiadores da área artística. Trata-se de um livro formado por colagens em cartolina preta de papéis de filtro contendo figuras multicoloridas. O livro foi publicado em alemão em 1866 e sua capa (Figura 1B) traz 22 figuras coladas ao redor do título: “*Das Od als Bildungstrieb der Stoffe: Veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern*”. A capa ainda apresenta o autor, F. F. Runge, e o valor pelo qual era vendido, quatro thalers (moeda de prata usada naquela época na Europa).⁴⁻⁶

Runge foi o primeiro a fazer uso da separação de pigmentos em papel com fins analíticos, com aplicação na indústria têxtil para a qual trabalhava. Os detalhes do desenvolvimento da técnica e de sua percepção como técnica analítica reprodutiva valem uma descrição detalhada, bem como vale o registro do efeito estético das separações por ele obtidas.



Figura 1. Capas dos livros: **A**–“ Der Bildungstrieb der Stoffe veranschaulicht in selbständig gewachsenen Bildern: (Fortsetzung der Musterbilder)” e **B**–“Das Od als Bildungstrieb der Stoffe: Veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern” de F. F. Runge. **A**, Reprodução da ref. 4. **B**, Reprodução da ref. 5

2.1. Biografia de Friedlieb Ferdinand Runge

Friedlieb Ferdinand Runge (1795-1867) nasceu em Billwerder, subúrbio de Hamburgo na Alemanha. Aos 16 anos se mudou para Lübeck para dar início ao aprendizado de farmácia junto a seu tio. Com 22 anos inscreveu-se para estudar medicina na Universidade de Berlim. Dois anos depois mudou-se para a Universidade de Gottingen, e após um ano para a Universidade de Jena, onde concluiu seu curso em 1819. No entanto, Runge nunca praticou medicina, porque nos últimos anos do curso se interessou pela química, em especial pelo estudo de substâncias venenosas de plantas. Runge dedicou-se ao estudo dos efeitos da atropina, presente na planta beladona (*Atropa belladonna*).⁶

Em 1819, Runge foi convidado pelo escritor e pensador alemão Goethe para demonstrar o interessante efeito de dilatação da pupila causado pelo extrato de beladona. Runge fez a demonstração aplicando o extrato da planta no olho de um gato, Goethe ficou tão impressionado com o resultado que chegou a registrar os resultados em suas anotações.⁷ Neste encontro, Goethe deu a Runge uma amostra de grãos de café torrado e sugeriu a ele que os incluísem em suas pesquisas, devido à possível presença de uma substância estimulante nos grãos de café. Goethe estava correto, poucos meses depois do encontro, Runge foi o primeiro a isolar a cafeína.⁵

Em 1819, Runge mudou-se para Berlim e assumiu a docência de química na Universidade. Em 1822, obteve o título de Doutor em Química pela Universidade de

Berlim, com o estudo sobre o corante índigo. No ano seguinte, foi para Breslau, atualmente Polônia, e associou-se como docente na Universidade local. Após alguns meses, fez uma viagem de mais de dois anos para visitar laboratórios e estudar plantas industriais e instalações na Suíça, França, Holanda e Inglaterra, acompanhando o filho de Carl Milde, um rico empresário de Breslau. Em 1826, Runge retornou a Breslau e juntou-se à fábrica têxtil de Milde.⁶

Paralelamente ao trabalho com corantes têxteis, Runge continuou a lecionar química na Universidade, e dedicou-se a escrever livros de química. Sua intenção era

popularizar a química. A prova de seu sucesso, são as tiragens de até 15.000 cópias de seus livros, número enorme para a época.⁶

Em 1832, Runge deixou Breslau para trabalhar na fábrica química do Dr. Hempel, em Oranienburg, como diretor técnico, onde permaneceu por 20 anos. A fábrica era uma grande exportadora de matéria-prima, em especial para a indústria de corantes, chegando a possuir 150 funcionários.⁶

Runge aposentou-se da fábrica de Hempel em 1852, mas continuou como consultor. Nesse período, dedicou-se a escrever seus livros e à produção de vinho, outra paixão. Faleceu em março de 1867.⁶



Figura 2. Friedlieb Ferdinand Runge (1795-1867)

2.2. Os livros de Runge

O interesse de Runge por cores está relacionado a sua atividade na fábrica têxtil em Breslau, e posteriormente na fábrica de Hempel. Runge reuniu todo seu conhecimento em tingimento de algodão, em uma série de livros em 3 volumes.⁶

- A química da coloração I –
Discute o tingimento do algodão - 1834
- A química da coloração II –

Discute a impressão de têxteis – 1842

- A química da coloração III –
Discute a preparação de corantes - 1850

Em todos os exemplares, Runge apresentou como ilustrações pequenos pedaços de tecidos para demonstrar os padrões de cor. No terceiro volume (Figura 3), Runge mencionou e demonstrou que a utilização de um pequeno pedaço de papel de filtro é muito útil para testar soluções de tingimento:^{6,7}

“...devido a sua força de capilaridade, separa os componentes de uma gota colocada no centro... cria uma imagem com

uma parte central escura e áreas ou anéis coloridos ou mesmo incolores.”

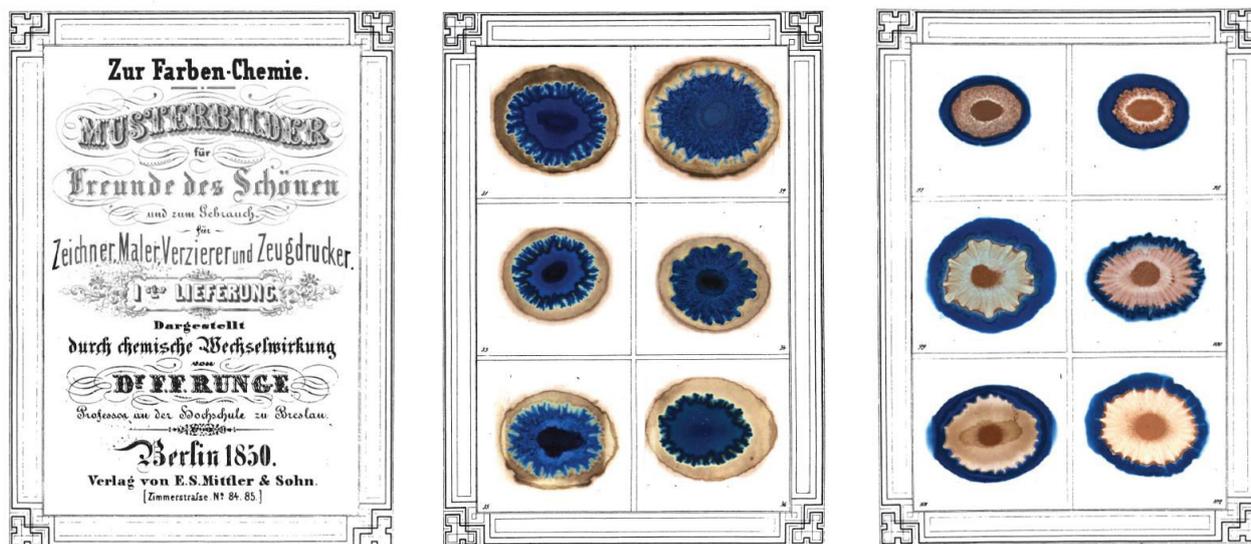


Figura 3. Capa e figuras 31 a 36 e 91 a 102 do livro: A química da coloração III de F. F. Runge de 1850. Reprodução da ref. 7

Runge ficou fascinado com a capacidade do papel de filtro em separar os pigmentos de tintas, em especial as de cor escura, que eram difíceis de identificar em solução.⁶

Em 1855, Runge publicou um livro inteiramente dedicado a seus discos de papel de filtro com os desenhos formados por pigmentos (Figura 1A). Abaixo de cada figura está afixado um cartão com a composição da mistura de pigmentos utilizados e instruções

para reprodução (Figura 4). A Figura 5 traz as principais figuras obtidas por Runge, que constam dessa publicação.

Em 1866, apenas um ano antes de sua morte, Runge publicou seu último livro com mais discos de papel filtro (Figuras 6 e 1B). Aparentemente, Runge dedicou seus últimos anos de vida à produção destas figuras, provavelmente mais com a finalidade artística do que analítica.



Figura 4. Cartão com instruções para reprodução do experimento com pigmentos. Reprodução da ref. 4



Figura 5. Mosaico de imagens formadas pela aplicação de misturas de pigmentos em papel de filtro, produzidas por Runge. Reprodução da ref. 4

Runge demonstrou nesse e nos demais livros, uma preocupação em provar que seus experimentos eram reprodutíveis. Para isso,

em geral, ele apresentou em uma mesma página duas figuras do mesmo experimento (Figura 7).

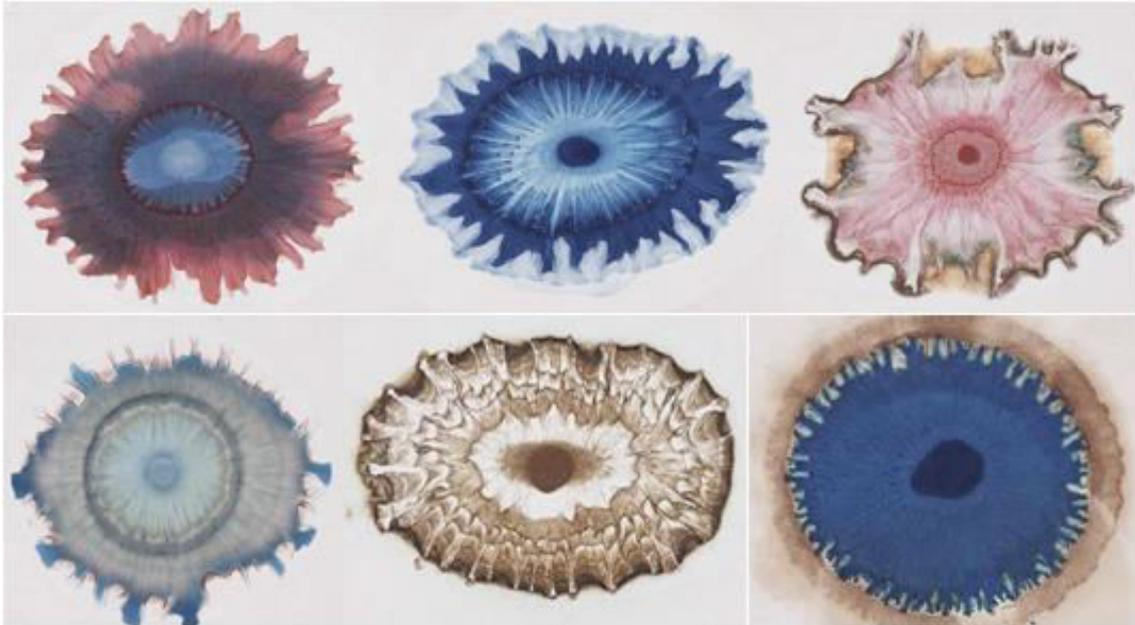


Figura 6. Mosaico com mais separações de pigmentos em papel filtro realizadas por Runge. Reprodução da ref. 5

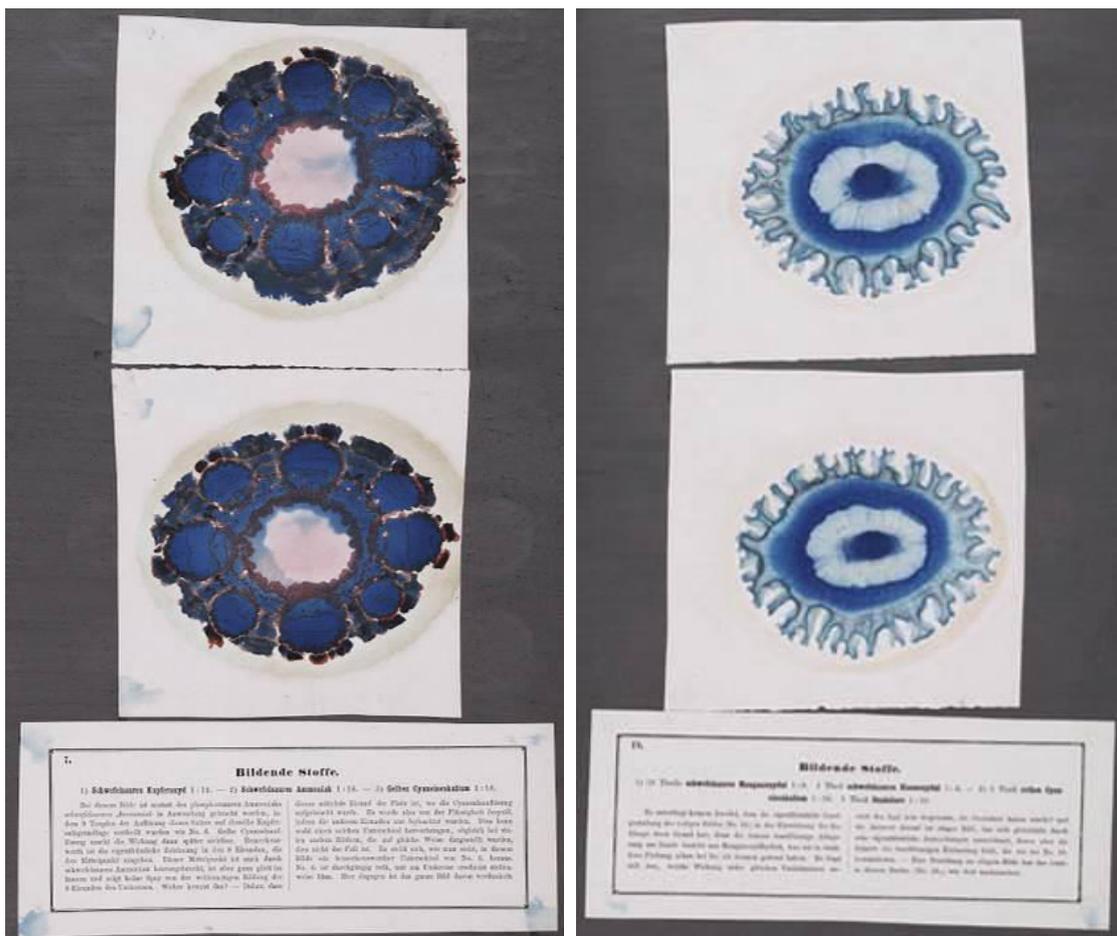


Figura 7. Experimentos feitos em papel de filtro demonstrando a reprodutibilidade dos testes com misturas de pigmentos. Reprodução da ref. 5

3. A contribuição de Schönbein

Christian Friedrich Schönbein (1799-1868), professor de química da Universidade da Basiléia na Suíça, é reconhecido principalmente pela descoberta do ozônio e pela invenção da nitrocelulose. Fato no mínimo curioso, sem, no entanto, ter relação com a cromatografia, foi a descoberta acidental do explosivo nitrocelulose, em 1845. Ao realizar experimentos na cozinha de sua casa, Schönbein usou um avental de sua esposa para limpar respingos de uma mistura de ácidos nítrico e sulfúrico. Ao colocar o avental para secar sobre o fogão, este se incendiou e desapareceu quase que instantaneamente.⁹

O trabalho que o levou a descoberta do ozônio é o que o relaciona à história da cromatografia. É de 1839 o primeiro relato de uma substância responsável pelo odor característico que aparecia no eletrodo positivo quando se fazia a eletrólise da água, o mesmo odor produzido por um arco elétrico entre dois eletrodos. Schönbein sugere que tal odor característico seja oriundo de uma substância química, e dá a ela o nome de ozônio.⁹

Em carta escrita a Berzelius em 14 de abril de 1844, Schönbein menciona a utilização de tiras de papel embebidas em solução de amido contendo iodeto de potássio para a identificação qualitativa do ozônio. Dentre os demais testes para detectar este gás, o teste com as tiras de papel mostrou-se o mais sensível e conveniente, indicando a presença do ozônio mesmo quando seu odor característico não era perceptível. A presença do ozônio decompõe o iodeto de potássio gerando iodo livre, que ao reagir com o amido colore de azul o papel.¹⁰

Schönbein registrou, ao fazer experimentos com tiras de papel, que ao

mergulhar uma ponta da tira em solução aquosa, o solvente e as substâncias dissolvidas subiam pelo papel com velocidades diferentes. Tais observações levaram um de seus alunos, Friedrich Goppelsroeder, a dedicar praticamente toda sua carreira científica a realizar separações de pigmentos em tiras de papel.¹¹

4. A contribuição de Goppelsroeder

Friedrich Goppelsroeder (1837-1919) publicou um livro, em 1901, (Figura 8) com os resultados da técnica que chamou de Análise Capilar (*Capillaranalyse*), em referência ao fenômeno de capilaridade, o qual julgava ser o responsável pela separação dos componentes de uma mistura em tiras de papel. Na verdade, o livro e suas demais publicações no assunto não trazem muita discussão acerca do fenômeno, e sim um relato detalhado de uma quantidade elevada de experimentos individuais.^{11,12}

Os experimentos de Goppelsroeder consistiam em mergulhar uma das pontas de uma tira comprida de papel na solução que desejava estudar (Figura 8). O papel permanecia durante todo o tempo imerso na solução. Este fato foi o que limitou os resultados obtidos por Goppelsroeder, pois desta maneira não ocorria à clara separação das substâncias presentes na amostra, porque as zonas acabavam sobrepondo-se umas às outras.¹¹ Se Goppelsroeder tivesse ao menos uma única vez aplicado uma quantidade finita de amostra ao papel, e deixado a análise evoluir apenas com solvente puro, as separações seriam mais definidas e muito provavelmente hoje ele seria conhecido como o pai da cromatografia.¹³

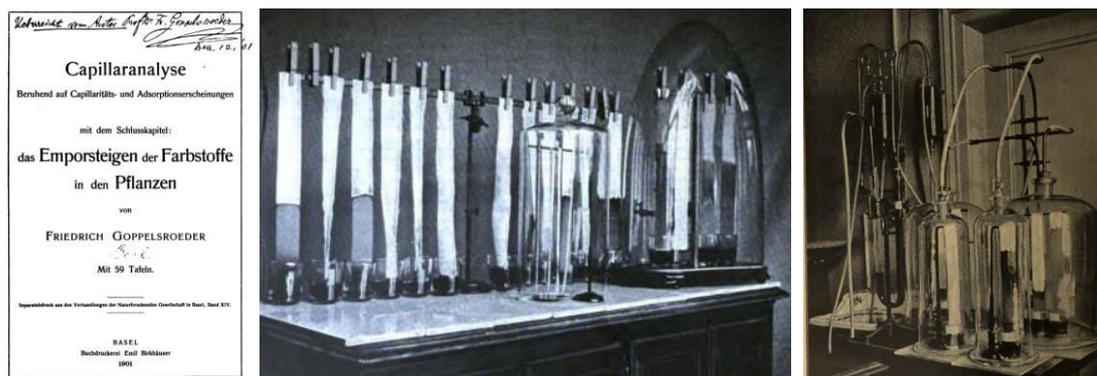


Figura 8. Capa do livro e experimentos de Goppelsroeder com tiras de papel. Reprodução da ref. 12

5. A invenção da cromatografia

5.1. Biografia de Mikhail Semenovich Tswett

Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919) (Figura 9) nasceu em Asti na Itália em 14 de

maio de 1872. Filho de russos, seus pais estavam em férias a caminho do lago Maggiore, no norte da Itália. No entanto, devido às condições de saúde de sua mãe grávida, seus pais foram obrigados a interromper a viagem na cidade de Asti. Sua mãe faleceu pouco tempo após seu nascimento, e seu pai mudou-se para a Suíça. Tswett viveu na Suíça durante 24 anos, graduando-se em botânica na Universidade de Genebra e, em 1896, recebeu seu PhD.^{14,15}

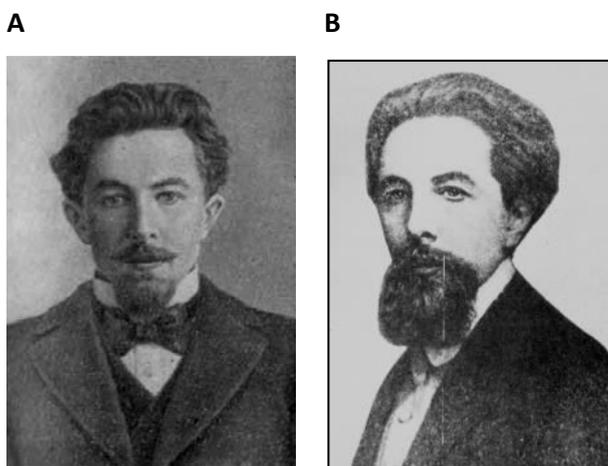


Figura 9. Fotos de Mikhail Semenovich Tswett

Em 1896, Tswett deixou a Suíça e após breve passagem pela Itália decidiu repatriar-se à Rússia para se juntar a seu pai. Em 1897, começou a trabalhar no laboratório de biologia da Academia de Ciências de São Petersburgo, ao mesmo tempo dedicou-se à preparação de uma dissertação de mestrado, porque o sistema russo exigia mestrado feito na Rússia para uma colocação acadêmica

júnior, e doutorado russo para uma colocação acadêmica sênior. A maioria de seus experimentos foi conduzida no laboratório de fisiologia e anatomia de plantas da mesma instituição. Tswett enfrentou muitas dificuldades, pois estava longe de ser fluente em russo, sua língua nativa era o francês.^{14,16}

Em 1901, Tswett defendeu sua dissertação de mestrado na Universidade de Kazan, sob o título: “Um estudo físico químico do grão de clorofila. Experimentos e análises”. A qualificação foi considerada um sucesso. O título de mestre, no entanto, não lhe rendia qualquer benefício financeiro extra, e Tswett para poder financiar sua pesquisa lecionava em escolas secundárias.¹⁶

Durante palestra ministrada em março de 1903, Tswett falou sobre uma nova categoria de fenômeno de adsorção e sua aplicação em análises bioquímicas. Sua apresentação causou uma acalorada discussão dentre os presentes. No mesmo ano ele publicou um relatório sobre o assunto. Por isso, é dado ao

ano de 1903 o crédito do nascimento da cromatografia. Em 1906, Tswett publicou dois artigos descrevendo a análise cromatográfica e sua aplicação ao estudo da química da clorofila.¹⁶

Em 1908, Tswett foi aceito na equipe do Instituto Politécnico de Varsóvia para estudar botânica. Em 1910, defendeu com elogios sua tese de doutorado na Universidade de Varsóvia, embora tivesse obtido PhD, em 1896, na Universidade de Genebra.

Tswett faleceu em 26 de junho de 1919, aos 47 anos, devido a uma doença cardíaca. Seu túmulo (Figura 10) encontra-se em um convento na cidade russa de Voronezh.^{15,16}



Figura 10. Lápide de Tswett na cidade russa de Voronezh, onde se lê a inscrição: “Ele inventou a cromatografia, separando moléculas mas unindo pessoas”

5.2. Relatório preliminar de Tswett publicado em 1903

O relatório publicado em 1903 por Tswett é considerado o marco da invenção da cromatografia, trata do novo fenômeno de adsorção e sua aplicação em análises bioquímicas. O foco dos estudos de Tswett sempre foi à clorofila.

Tswett definia a clorofila como um grupo de pigmentos solúvel em álcool que dá aos

vegetais sua coloração característica. Ainda em seu relatório, Tswett afirmou que tal grupo de pigmentos contém não menos do que cinco substâncias divididas em duas categorias, as clorofilas e as xantofilas. Na época já havia relatos de separação destas substâncias com a utilização de sistemas binários de solventes.

Ao realizar testes de solubilidade de seus extratos de plantas, Tswett observou que ao secar um extrato de clorofila em papel de filtro, sob vácuo, este se tornava verde,

sendo possível extrair seletivamente do papel de filtro os carotenos e a clorofila. Tswett concluiu que os pigmentos e a celulose do papel de filtro estavam envolvidos em um fenômeno de adsorção, e que estudos sistemáticos desta questão trariam luz ao fenômeno de adsorção e permitiriam a elaboração de uma nova técnica de separação física de substâncias.¹⁷

Vislumbrando as potencialidades de suas afirmações e descobertas, Tswett efetuou extensivos experimentos, chegando a listar mais de 100 substâncias estudadas como adsorventes, dentre elas:

- Enxofre, inulina, magnésio, zinco e chumbo;
- Óxidos de magnésio, ferro e prata;
- Hidróxidos de alumínio e potássio;
- Ácidos bórico, oxálico e tartárico;
- Sais de ácido clorídrico, perclórico e sulfúrico;
- Aldeídos e amidas;
- Hidrocarbonetos e alcaloides.

Dentre as variadas substâncias e classes químicas, Tswett chegou a testar materiais como lã de vidro, solo, carvão e pó de osso e sangue.

Os testes com os adsorventes eram conduzidos de três maneiras diferentes e chamam muita atenção, pois muitos dos procedimentos são utilizados até os dias de hoje:

1- O adsorvente escolhido era macerado a um pó fino e colocado em um tubo fino de vidro com uma tampa de papel de filtro para reter o pó. O pó era densamente acamado no tubo com o auxílio de um bastão de vidro. Uma porção de solvente era passada através do pó para remover o ar, e por fim a solução com o extrato de clorofila era vertida diretamente no topo da coluna formada. A filtração era,

então, realizada com a utilização de uma pequena pressão negativa ou positiva.

2- O extrato de clorofila era colocado em um tubo de ensaio e uma porção do adsorvente era adicionada. Após agitação, o tubo era centrifugado e o adsorvente acumulava-se no fundo do tubo com os pigmentos.

3- No caso de adsorventes higroscópicos, a substância era colocada em um graal contendo uma porção de solvente e a mistura macerada.

Tswett concluiu que todas as substâncias testadas eram capazes de adsorver parte ou a totalidade dos pigmentos da clorofila. No texto, ele descreveu os resultados de suas investigações e calculou a área superficial para um dos adsorventes utilizados, a inulina. Considerando partículas uniformes de aproximadamente 2 μm de diâmetro, Tswett chegou ao valor de 2,22 m^2 por grama de inulina. Isso mostra que ele tinha indícios da compreensão da relevância do tamanho da partícula no fenômeno da adsorção.

Tswett descreveu detalhadamente o fenômeno de adsorção dos pigmentos com os testes com inulina, relatando que ao agitar o extrato na presença do adsorvente, parte dos pigmentos era imediatamente adsorvida e o sólido precipitava no fundo do frasco com coloração verde. Ao mesmo tempo, o sobrenadante gradualmente clarificava e torna-se amarelo. Se quantidades suficientes de adsorvente fossem adicionadas, a solução final apresentava apenas a presença de carotenos, o que foi confirmado espectroscopicamente.¹⁷

Diferentes solventes foram testados para liberar os pigmentos adsorvidos na inulina, e Tswett concluiu que apenas com álcool todos os pigmentos eram solubilizados do adsorvente. Avaliações espectroscópicas demonstraram que as soluções assim obtidas continham os pigmentos em sua forma original, ou seja, o fenômeno de adsorção e dessorção não alteravam a estrutura dos pigmentos. Desta maneira, Tswett

compreendeu a reversibilidade do processo de adsorção, afirmando que é possível, após a dessorção dos pigmentos, voltar a adsorvê-los com nova porção de inulina ou com outro adsorvente.

Tswett descreveu que o fenômeno de adsorção era mais claramente demonstrado quando o extrato vegetal era filtrado através do adsorvente. Observou que inicialmente o líquido que passava através do adsorvente apresentava-se incolor, em seguida tornava-se amarelo enquanto uma camada verde intensa formava-se no topo da coluna de inulina.

“Logo uma fronteira amarela aparece na borda inferior do anel. Durante passagem subsequente de solvente puro através da coluna de inulina, tanto o anéis verdes e amarelas são consideravelmente ampliados e espalhados até certo limite. Isto prova que aqui (assim como em outros processos já conhecidos de adsorção) a quantidade de substância adsorvida depende da sua concentração”.¹⁷

Tswett ainda nomeava o processo que presenciava como uma filtração. Descreveu que se o comprimento da coluna fosse suficientemente longo para reter todas as substâncias, o anel amarelo formado se movia através do adsorvente. Esse movimento, ao atingir a base da coluna, fazia com que a solução que fluía tornar-se amarela novamente.

Com experimentos usando outros adsorventes além da inulina, Tswett conseguiu diferenciar o fenômeno físico da adsorção de reações químicas sofridas pelos pigmentos, como oxidação, que alteravam os resultados das avaliações espectroscópicas. Tswett citou adsorventes ácidos e sais básicos e ácidos como agentes de alterações químicas dos pigmentos, podendo em alguns casos levar a sua total oxidação.

Tswett chamou a atenção ainda para a especial capacidade de adsorção de alguns materiais, como carvão e carvão de osso. Os pigmentos adsorvidos por esses materiais não podiam ser extraídos com álcool puro,

que era extremamente eficaz para os demais adsorventes. Tswett sugeriu que a eficiência de adsorção com estes materiais estava relacionada à presença de grande quantidade de poros nessas substâncias, e comparou esta capacidade com a de materiais finamente moídos.

Como conclusão de seu exaustivo trabalho, Tswett percebeu a importância analítica do mecanismo que acabara de descrever:¹⁷

“Com base no que precede, um novo método de separação física de diferentes substâncias em meios orgânicos pode ser proposto. O princípio deste método baseia-se na propriedade de substâncias dissolvidas sofrerem processo de adsorção em materiais sólidos de origem mineral e orgânica. O montante da substância encontrada no composto de adsorção depende do grau de moagem, bem como da sua natureza, da natureza da substância dissolvida, e da natureza do solvente. Todas estas diferenças podem ser utilizadas para a separação da substância por meio de sua precipitação fracionada de adsorção [...] Sem qualquer dúvida, uma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo de adsorção levaria à perfeição de sua aplicação analítica”.

5.3. As publicações de 1906

Tswett submeteu, em 1906, dois artigos à publicação, porque sua publicação de 1903, em russo, era apenas um relatório e permanecia desconhecida até mesmo por colegas próximos. Os manuscritos foram submetidos ao jornal da Sociedade Alemã de Botânica, periódico Europeu líder, no assunto, na época. Em suas publicações, Tswett descreveu em detalhes o método cromatográfico para a separação de pigmentos de plantas. O segundo artigo contém a mais famosa declaração de Tswett:¹⁴

Como raios de luz no espectro, os diferentes componentes de uma mistura de pigmentos, obedecendo a uma lei, são resolvidos na coluna de carbonato de cálcio e podem então ser qualitativa e quantitativamente determinados. Eu chamo esta preparação de cromatograma, e o método correspondente de método cromatográfico.

A palavra cromatografia é composta por duas raízes gregas, **chroma** que significa cor e **graphein** que significa escrever, podendo então o termo ser traduzido como “**escrita das cores**”. Tswett provavelmente estava referindo-se a visualização dos anéis multicoloridos e separados na coluna cromatográfica. No entanto, existe outra interpretação para o termo: Tswett em russo escreve-se **цвет**, foneticamente lê-se *tsvet*, e a tradução da palavra é “COR”. Desta maneira, cromatografia poderia ser traduzida também como: “**Escrita de Tswett**”.^{14 18}

O fato de Tswett não explicar a origem da definição do termo, apenas nomeando o método criado no artigo de 1906, deixa em aberto a discussão. Entretanto, a popularização do termo cromatografia leva a discussão apenas para um nível de registro histórico.

5.4. O aparato cromatográfico de Tswett

Nos dois artigos de 1906, Tswett ainda definiu e descreveu com detalhes a cromatografia. A Figura 11 (a) apresenta o aparato construído para a cromatografia, capaz de correr até cinco colunas cromatográficas ao mesmo tempo. Neste sistema cromatográfico, Tswett montou um mecanismo com uma pera de borracha capaz de aumentar a pressão sobre a coluna para facilitar o fluxo do solvente através do adsorvente. Após a separação dos pigmentos, as colunas eram removidas do aparato e o adsorvente mecanicamente retirado da coluna. Os anéis coloridos eram, então, fisicamente separados e as substâncias removidas do adsorvente por meio de extração com solvente. A figura apresenta a opção de uma montagem para uma coluna maior (b), onde a base da coluna era submetida à baixa pressão com o auxílio de uma trompa d'água acoplada ao frasco. E, por fim, Tswett apresenta o primeiro cromatograma com a identificação das substâncias separadas (c).¹⁴

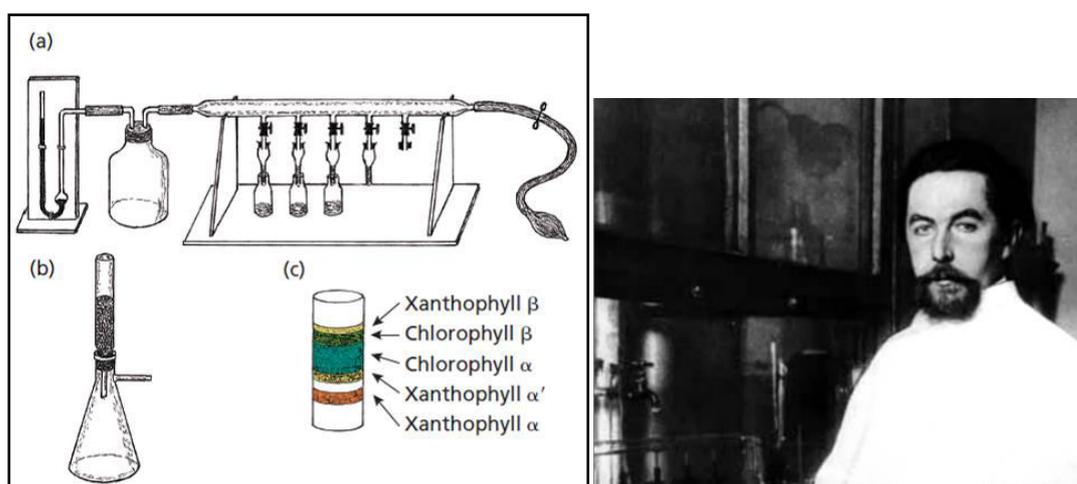


Figura 11. A esquerda o esquema conforme apresentado por Tswett no artigo de 1906, e a direita o autor ao lado de sua “Unidade Cromatográfica”

Na Figura 12 estão esquematicamente representadas as montagens de colunas feitas por Tswett, em A, uma das cinco colunas utilizadas no seu aparato de separação. A fase estacionária era acondicionada em camada de

aproximadamente 4 centímetros de altura por 3 milímetros de diâmetro. Em B, uma coluna maior de 5 a 6 centímetros de altura com 2 centímetros de diâmetro. Em C, uma coluna usada para cromatografia preparativa com 8 centímetros de altura e 3 de diâmetro.

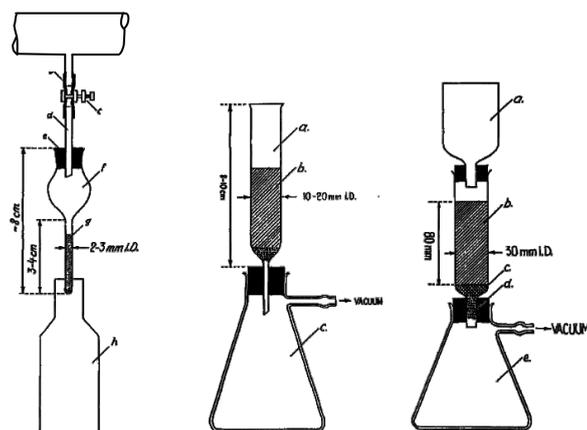


Figura 12 – Esquemas de montagens das colunas cromatográficas de Tswett

Em seus dois trabalhos acerca do método cromatográfico, Tswett discutiu sobre a correta seleção do solvente, sobre a possibilidade de melhorar a separação das substâncias através da adição de outro solvente durante a corrida cromatográfica, ou ainda pela substituição do solvente após a primeira separação. Tswett enfatizou que, apesar de todo seu trabalho ter sido realizado com a separação dos pigmentos de plantas, seu método poderia ser aplicado a outras substâncias, inclusive substâncias incolores.¹⁴

As afirmações e registros de Tswett fazem referência ao que hoje chamamos de modo de eluição gradiente, onde a composição da fase móvel é alterada no decorrer da corrida cromatográfica, e ainda vislumbra as aplicações da técnica a toda sorte de substâncias químicas.

5.5. As publicações de 1910 e 1911

Em 1910 Tswett resumiu todo o conhecimento adquirido com seus experimentos em um livro publicado, em russo, sob o título: “Clorofilas no mundo animal e vegetal” (Figura 13). O livro, na verdade sua tese, lhe serve para a obtenção do grau de Doutor. Em 1911 a publicação recebeu o prêmio Akhmatov da Academia Imperial Russa de Ciências, um importante prêmio científico.¹⁴

Seu livro contém novos experimentos com propósitos preparativos e detalhes de separações cromatográficas.¹⁴

Em 1911, Tswett publicou sete artigos em jornais científicos alemães e franceses. Em uma destas publicações, incluiu uma discussão bastante detalhada de vários carotenoides, termo proposto por ele no artigo e que rapidamente foi incorporado ao vocabulário científico.¹⁴



Figura 13. Capa do livro “Clorofilas no mundo animal e vegetal”, publicado em russo, em 1910, por Tswett

5.6. Considerações sobre os experimentos de Tswett

Os experimentos realizados por Tswett não foram fáceis de realizar. Ele mostrou com seu trabalho científico que tinha grandes habilidades práticas e teóricas. Certamente o que conduziu Tswett ao sucesso com seus experimentos foi o seu grande interesse pela fisiologia vegetal. Ele tinha fascinação pelo mistério da fotossíntese, sendo a cromatografia apenas a ferramenta para desvendá-lo. Prova dessas afirmações é a dificuldade de reprodução destes experimentos por outros pesquisadores. Há apenas dois registros da utilização com sucesso de suas técnicas na década de 1910.¹⁹

Ainda nos dias atuais, com o avanço do conhecimento e uso de novos materiais, são muitas as dificuldades na reprodução dos experimentos de Tswett. A Figura 14 mostra a foto de uma separação cromatográfica de um extrato vegetal em uma coluna de celite® e óxido de magnésio, reproduzindo o método de separação dos pigmentos vegetais

desenvolvido por Tswett.²⁰ Além da invenção da cromatografia, e com o uso dela, Tswett resolveu o problema do isolamento da clorofila e mostrou a existência de duas estruturas, as clorofilas a e b. Estas foram suas grandes contribuições para o grupo de pesquisadores russos que dedicaram suas carreiras ao estudo da fotossíntese.¹⁵

Tswett se preocupava em deixar claras as diferenças de sua invenção com a técnica de análise capilar utilizada por Goppelsroeder (item 4). Apesar disto, muitos historiadores consideram Goppelsroeder o pai da cromatografia.²¹

Tswett enfatizou que as substâncias separadas por cromatografia são ao menos tão puras quanto às obtidas por meios tradicionais, como através de reações químicas, destilação e recristalização. De fato, ainda nos dias atuais, é usual o preparo de substâncias puras através da cromatografia, sejam para caracterizações químicas ou para utilização como padrões analíticos.^{14,20,22}

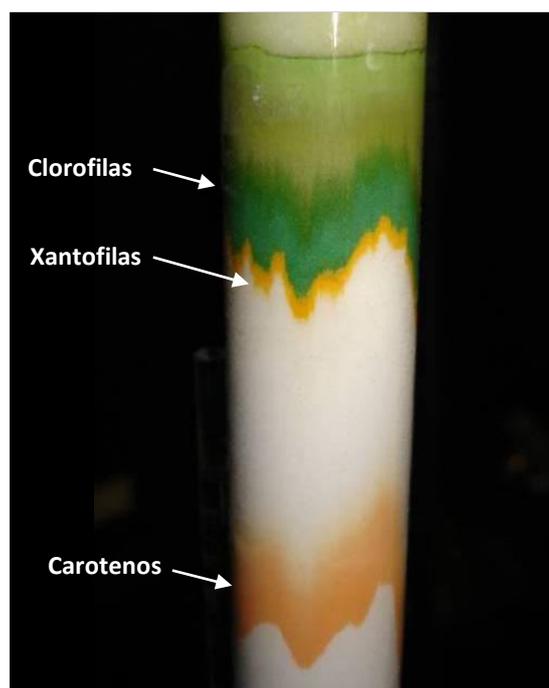


Figura 14. Reprodução do experimento de Tswett, separação de um extrato de folhas vegetais por cromatografia em coluna aberta. Reprodução da ref. 20

O desenvolvimento da indústria farmacêutica, da medicina e da química, em especial a química de produtos naturais, além do monitoramento ambiental, seriam praticamente impossíveis sem a utilização das múltiplas técnicas cromatográficas.²³

Tswett foi indicado para receber o prêmio Nobel de 1918, no entanto não foi o vencedor. Fritz Haber foi o premiado, em função do desenvolvimento da síntese da amônia a partir dos gases hidrogênio e nitrogênio.²⁴

A revista Nature, em 1992, publicou artigo homenageando Tswett em comemoração ao centenário da invenção da cromatografia.²⁵

6. Utilização e evolução da cromatografia nos anos pós Tswett

Richard Willstätter, professor de química orgânica em Munique, era o grande competidor de Tswett no estudo da clorofila. Ele obteve a clorofila purificada através de

cristalização fracionada, e esta forneceu uma única banda empregando o método de Tswett. Acreditando apenas nos métodos clássicos de purificação, Willstätter argumentou que a clorofila sofria degradação quando submetida ao processo de adsorção proposto por Tswett. Hoje em dia sabe-se que Tswett estava correto quanto às duas estruturas da clorofila. No entanto, a afirmação de Willstätter foi uma das razões que levaram ao esquecimento e desuso da cromatografia durante quase 25 anos.²⁶

O método e os resultados obtidos por Willstätter, para o isolamento e a identificação da clorofila, foram apresentados em forma de livro em 1913²⁶ e o levaram a receber o prêmio Nobel de química em 1915,²⁸ tornando-o a principal referência no assunto. No livro, Willstätter afirma que a cromatografia de Tswett era uma estranha maneira de se obter compostos puros, e que Tswett jamais havia lidado com substâncias puras.

Outras questões, entretanto, contribuíram para o que se chama de período de dormência da cromatografia. Se são verdades

ou suposições, são ainda motivo de muita discussão entre historiadores:²⁹

1- Químicos e botânicos não compreenderam o funcionamento do método de Tswett e cometeram erros aos empregá-los;

2- O livro publicado por Tswett, em 1910, foi escrito em russo, língua inacessível à maioria dos pesquisadores da época;

3- Houve preconceito por parte dos químicos, pois um botânico russo iniciante estava sugerindo uma revolução na química analítica;

4- Tswett passou por tragédias pessoais e profissionais, com a primeira grande guerra sabotando sua descoberta;

5- A rejeição de Willstätter e a de outros químicos alemães;

6- Antes de 1930 os químicos visavam o isolamento de grandes quantidades de componentes principais, e não a separação de todos os componentes do material de estudo;

7- Os resultados de Tswett discordavam dos obtidos com técnicas consideradas clássicas e confiáveis, como partição e recristalização.

6.1. A contribuição de Charles Dhéré

Após as declarações de Willstätter, apenas alguns poucos cientistas fizeram uso da invenção de Tswett. Um dos primeiros pesquisadores foi o francês Charles Dhéré (1876-1955). Dhéré graduou-se em medicina e, em 1900, se tornou professor de fisiologia,

química biológica e microbiologia na Universidade de Friburgo, na Suíça. Em 1909, concluiu o doutorado e seu grande interesse científico era a investigação de substâncias com importância biológica, particularmente com técnicas espectroscópicas de ultravioleta e fluorescência.³⁰

Para seus estudos espectroscópicos, Dhéré necessitava obter as substâncias de interesse em estado puro e, por isso, se aproximou da cromatografia. Dhéré iniciou, por volta do ano de 1911, seus trabalhos com cromatografia apenas alguns poucos anos após as publicações de Tswett. Os trabalhos mais importantes foram as publicações de dois de seus alunos, Rogowski e Vegezzi.³⁰

Wladyslaw Franciszek de Rogowski (1886-1945) nasceu em Varsóvia. Em 1911, ele integrou a equipe de Dhéré como aluno de doutorado e realizou estudos espectroscópicos com as clorofilas. Rogowski concluiu o doutorado em 1912, no entanto, sua tese apenas foi registrada em 1914. Neste documento está descrito com detalhes a técnica cromatográfica utilizada, bem como o aparato desenvolvido.³⁰

O aparato de Rogowski consistia em uma coluna de vidro com 60 a 80 mm de comprimento que não era afunilada na sua extremidade inferior, como a utilizada por Tswett, e sim fechada por uma cortiça perfurada que era acomodada sobre um disco de porcelana (Figura 15). O adsorvente utilizado era carbonato de cálcio. Desta maneira, Rogowski podia retirar a rolha e remover com mais facilidade a fase estacionária após a separação dos pigmentos da mistura, separando mecanicamente os anéis coloridos de maneira a não ter mais os problemas de contaminação de substâncias presentes nos outros anéis.³⁰

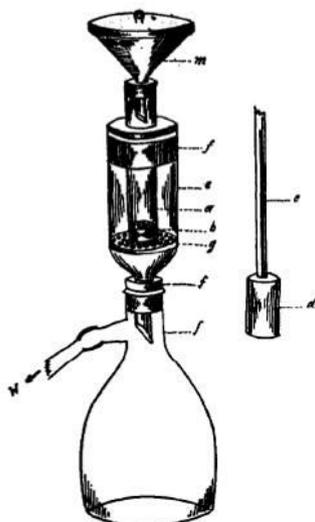


Figura 15. Aparato cromatográfico usado por Rogowski. Com a coluna não afunilada na parte inferior era possível remover a fase estacionária com auxílio de um bastão de madeira

Com esta técnica, Rogowski conseguiu isolar as clorofilas *a* e *b* além de alguns carotenoides para seus estudos espectroscópicos. Os resultados corroboraram os resultados de Tswett, que afirmou que a clorofila cristalizada não era uma substância pura, e sim uma mistura. O método clássico para o isolamento das clorofilas foi proposto por Willstätter e colaboradores em 1913, e se utilizava de fracionamento em solventes imiscíveis e cristalização. Os espectros obtidos por Rogowski, apresentados em sua tese, são notavelmente mais puros do que os apresentados por Willstätter em suas publicações. Estudos posteriores provaram que a clorofila *b* isolada por Willstätter apresentava contaminação da ordem de 15% com a clorofila *a*. O fato de Rogowski não conseguir obter um espectro igual ao de Willstätter para a clorofila *b* o deixou bastante aborrecido, pois a banda faltante de seu espectro era justamente a contaminação por clorofila *a* decorrente do método clássico descrito por Willstätter, considerado a maior autoridade no assunto.³⁰

Após Rogowski, o próximo trabalho do laboratório de Dhéré com a utilização e aprimoramento da técnica cromatográfica de

Tswett foi a tese de Vergezzi, outro de seus alunos.³⁰

Gluglielmo Vergezzi (1890-1955) nasceu na Suíça e juntou-se a equipe de Dhéré em 1913, concluindo seu doutorado em 1916. O estudo conduzido por Vergezzi tratava da investigação espectroscópica de pigmentos presentes em invertebrados. Seus resultados foram reunidos em seis publicações com coautoria de Dhéré. O aparato cromatográfico utilizado por Vergezzi diferia muito pouco do desenvolvido por Rogowski.³⁰

Além de ser o primeiro na Europa a reconhecer a importância do método de Tswett, Dhéré foi o primeiro a publicar, em 1943, um artigo com uma discussão detalhada do trabalho científico do mestre e uma biografia do pai da cromatografia.³⁰

6.2. A contribuição de Leroy Sheldon Palmer

Ao mesmo tempo em que Dhéré iniciou seus trabalhos com cromatografia na Europa, Leroy Sheldon Palmer (1887-1944) usou o método de Tswett em sua pesquisa sobre carotenoides nos Estados Unidos.³¹

Palmer iniciou por volta de 1910 seus estudos na Universidade de Missouri com pigmentos de leite, e concluiu, em 1913, sua tese de doutorado sob o título “O principal pigmento amarelo natural da gordura do leite”. Em 1922, Palmer publicou o livro “Carotenoides e pigmentos relacionados. Os Cromolipideos”.^{31,32}

A abordagem de Palmer se concentrava no fato da coloração da manteiga produzida com leite de vaca ser amarela na primavera e no verão, enquanto que no inverno a coloração tornava-se pouco intensa. Palmer sugeriu que a mudança na coloração da manteiga poderia estar relacionada com a dieta das vacas, que no verão e primavera alimentavam-se de pastagens naturais, enquanto no inverno alimentavam-se de vegetação seca ou armazenada (silagem). Por ser a coloração amarela da manteiga e de outros derivados de leite a principal característica relacionada à sua qualidade, mesmo se sabendo que não há diferenças significativas no valor nutricional do produto, os produtores tentavam obter um produto natural o mais amarelo possível.³³

A tese de Palmer foi o primeiro relato a estabelecer a relação direta entre a ingestão de carotenoides presentes na alimentação de vacas e a composição do leite e de seus derivados. Representou a primeira prova direta do fato de os pigmentos presentes no leite e nos tecidos animais serem os mesmos presentes na alimentação e, conseqüentemente, uma prova de que os animais não são capazes de produzi-los.³¹

Palmer estendeu seus estudos da presença de carotenoides em algas, plantas, aves, peixes, anfíbios, insetos, em leite e tecidos animais de diversas espécies, incluindo seres humanos. Descobriu que alguns animais armazenam carotenoides seletivamente e outros não os armazenam, como os ovinos, suínos, coelhos e galinhas. Estas últimas armazenam xantofilas em seus tecidos e na gema do ovo.^{31,32}

Ao iniciar seus estudos sobre pigmentos, Palmer não seguiu o caminho óbvio que seria a metodologia de Willstätter de isolamento

de pigmentos. Aparentemente, Palmer teve acesso aos originais dos artigos de Tswett publicados em 1906 e percebeu a superioridade do seu método, que só foi consagrado no final da década de 1930.³¹

Palmer utilizou para suas separações um aparato cromatográfico recomendado por Tswett para separações de maiores volumes (Figura 11b). Utilizou sacarose e inulina como adsorventes, ao invés de carbonato de cálcio, seguindo as recomendações de Tswett para separação de substâncias que podem sofrer transformações químicas e estruturais em carbonato de cálcio. Sabe-se hoje que a rejeição de Willstätter se deu por conta de descuido de seus assistentes que não leram cuidadosamente os trabalhos de Tswett e ignoraram as recomendações neles contidas.³¹

Diferentemente de Dhéré e de seus alunos, Palmer optou pela separação cromatográfica dos pigmentos pela eluição das frações de cada fase, ao invés de separar mecanicamente os anéis. As soluções de pigmentos isolados assim obtidas eram, então, estudadas espectroscopicamente e através de reações químicas.³¹

Em sua publicação mais importante, o livro de 1922, Palmer dá a Tswett todo o crédito pelo método de separação. Apresenta ainda uma bibliografia com 13 publicações de Tswett.

Mesmo após os resultados obtidos por Palmer, um artigo de um dos tradutores de Willstätter tentou, em 1929, desacreditar o método de Tswett.³⁴ Finalmente, o próprio Willstätter encerrou a discussão em uma publicação de 1933.³⁵

Não é importante para o cientista se a sua própria teoria prova o certo no final. Nossos experimentos não são realizados para decidir se estamos certos, mas para obter novos conhecimentos. É por causa do conhecimento que aramos e semeamos. Não é inglorioso ter errado em teorias e hipóteses. Nossas hipóteses se destinam ao presente ao invés do futuro. Elas são indispensáveis para nós na

explicação dos fatos, para avivá-los e mobilizá-los e acima de tudo, abrir um caminho em regiões desconhecidas em direção a novas descobertas.

6.3. A redescoberta da cromatografia de Tswett

O aumento do interesse de químicos orgânicos por produtos naturais levou a redescoberta, no final da década de 1920, da cromatografia. Dentre os pesquisadores da época, destaca-se a pesquisadora britânica Katharine Hope Coward, considerada a quinta pessoa a trabalhar com cromatografia após Tswett. Katharine tinha como foco de seus estudos a identificação de carotenoides. Ela reproduziu com competência as separações em carbonato de cálcio descritas por Tswett e confirmou a existência de carotenoides muito semelhantes de difícil separação.^{26,36}

7. A cromatografia líquida em camada delgada

A cromatografia em coluna aberta não foi muito difundida, provavelmente pela falta de robustez do método. No entanto, a cromatografia plana em papel, introduzida por Martin, tornou-se a primeira técnica cromatográfica microanalítica. Foi introduzido o termo fator de retardamento R_f . Devido à baixa velocidade de separação da cromatografia em papel, surgiu na Rússia em 1938 a cromatografia em camada delgada ou fina. A técnica consistia na aplicação de uma fina camada de adsorvente em placas de vidro. As cromatoplasmas foram desenvolvidas, inicialmente com a utilização de amido para fixação do adsorvente à placa. Na sequência o amido foi substituído por sulfato de cálcio. A cromatografia em camada delgada tornou-se a metodologia analítica padrão em laboratórios de química orgânica e de farmácia. Ainda hoje, a metodologia é

utilizada devido à sua simplicidade e rapidez.²⁶

8. A cromatografia em fase gasosa

Em 1941, Martin e Synge publicaram um artigo com os resultados de uma nova forma de utilização de separação. Os autores enfrentavam dificuldades na separação de uma mistura de aminoácidos hidrolisados de proteínas, e tentaram uma separação baseada no fenômeno da partição. A ideia foi saturar sílica com água e então usá-la como fase estacionária. Desta maneira, a fase estacionária seria um líquido imobilizado, agindo a sílica apenas como um suporte, e a fase móvel seria outro líquido imiscível em água. A separação era fundamentada na diferença de partição das substâncias entre as duas fases líquidas, e não mais nas diferenças de adsorção. As separações dos aminoácidos ainda eram dificultadas pelo fato de serem substâncias incolores. Martin utilizava-se de indicadores misturados à água aplicada na sílica para visualização da separação. Os autores apresentaram seus resultados como sendo uma solução rápida e barata, em termos de material e aparatos, para a separação de hidrolisados de proteínas. Eles concluíram que seu método poderia ser utilizado também para separação de substâncias neutras, separadas pelas diferenças entre seus coeficientes de partição. No entanto, a mais impressionante contribuição da publicação foi a seguinte previsão:³⁷

A fase móvel não necessariamente precisa ser um líquido, mas pode ser um vapor [...] Separações muito refinadas de substâncias voláteis podem ser conseguidas em uma coluna onde um gás permanente é forçado a fluir através de gel impregnado com um solvente não volátil [...].

Apesar de não ser o foco da publicação, o

artigo antecipou a criação da cromatografia gasosa, que foi introduzida em 1952. Com a intensificação do seu uso, estimulado pela evolução da petroquímica, surgiram os estudos cinéticos que levaram às equações de eficiência que regem os fenômenos das separações cromatográficas.²⁶

Em 1952, Syngge e Martin receberam o prêmio Nobel de Química pela invenção da cromatografia de partição.³⁸

Hoje, os cromatógrafos a gás estão de tal maneira difundidos, que existe um equipamento funcionando remotamente na superfície de Marte para estudos de composição do solo e atmosférica, acoplado como instrumento de bordo ao jipe "curiosity" da Nasa, que aterrissou no planeta em 2012.

9. A contribuição de Tiselius e Claesson

Arne Wilhelm Kaurin Tiselius (1902-1971) e Stig Melker Claesson (1917-1988) foram dois pesquisadores do Instituto de Físico-Química da Universidade de Uppsala na Suécia. Promoveram ao menos duas grandes

contribuições para a evolução da cromatografia, a primeira é a incorporação de um sistema de detecção não visual ao aparato cromatográfico, a segunda é a criação da cromatografia de deslocamento.

Em 1941, Tiselius publicou um artigo sobre o desenvolvimento de um novo aparato para a análise de adsorção de Tswett. No aparato era incorporada uma cubeta para leitura óptica acoplada ao fluxo de efluente da coluna cromatográfica. Dessa maneira, era possível observar bandas correspondentes ao número de substâncias presentes na amostra. Tiselius demonstrou ainda ser possível a determinação qualitativa e quantitativa dos componentes. O método desenvolvido aplicava-se não apenas a substâncias coloridas e era de fácil adaptação para determinações quantitativas.³⁹

Em 1948, Claesson publicou um artigo onde apresenta um diagrama com um sistema de leitura do efluente da coluna, conforme idealizado por Tiselius, com o acoplamento de um sistema de introdução da fase móvel, na forma de um compartimento pressurizado por um êmbolo (Figura 16).⁴⁰

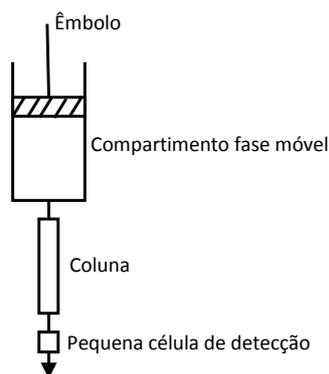


Figura 16. Diagrama de dispositivo para cromatografia

Tiselius classificou a cromatografia em três métodos distintos de eluição:⁴¹

1- Análise frontal – A mistura original é continuamente passada através da coluna, procedimento adotado por Goppelsroeder na análise capilar (item 4);

2- Eluição com solvente – A mistura original é colocada na coluna em pequeno volume e, então, levada através da coluna com adição de solvente puro, método usado por Tswett;

3- Eluição por deslocamento - A mistura original é colocada na coluna em pequeno volume e lavada com solução de um agente de deslocamento.

9.1. A cromatografia de deslocamento

A cromatografia de deslocamento foi introduzida, em 1943, por Tiselius. Nela, as substâncias a serem separadas são adsorvidas no topo da coluna, e uma solução contendo outra substância que seja mais fortemente adsorvida pelo adsorvente é então passada através da coluna fazendo com que o analito seja desorvido e, conseqüentemente, eluído. A técnica se aplica muito bem para análises preparativas, qualitativas e quantitativas, sendo os resultados limitados pela dificuldade de se encontrar o agente de deslocamento ideal em separações de misturas desconhecidas.⁴²

A técnica desenvolvida por Tiselius e Claesson foi aplicada com muito sucesso na separação de aminoácidos em colunas de troca iônica com eluição por deslocamento promovido pela variação de pH da fase móvel. Este tema será retomado mais a frente com a técnica utilizada e melhorada por Moore e Stein.

9.2. Encontro para discussão de análises cromatográficas: *The Faraday Society*

A revista “*Discussions of the Faraday Society*” promoveu em 24 de Setembro de 1949, no Departamento de Química da Universidade Reading na Inglaterra, o evento “Discussão geral em Análises Cromatográficas”. Mais de 250 membros e visitantes estavam presentes, dentre os convidados e autores destacam-se: S.

Claesson, S. Moore, A. Tiselius, A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, F. A. Robinson e S. M. Partridge. Os principais desenvolvedores da cromatografia puderam trocar informações nos campos em desenvolvimento da cromatografia líquida e, por este motivo, o evento pode ser considerado um importante marco na evolução da técnica.⁴³

10. A contribuição de Moore e Stein

O primeiro cromatógrafo líquido automático, com eluição por gradiente e com sistema de derivatização pós-coluna foi projetado por Moore e Stein, com a colaboração de Darrel H. Spackman, para análise de aminoácidos. O contexto e as descobertas que levaram a publicação de 1958,⁴⁴ com a descrição deste equipamento é outro grande marco da história da cromatografia líquida.

10.1. Biografia de Stanford Moore e Willian H. Stein

Willian Howard Stein (1911-1980) graduou-se em Harvard, em 1929, com especialização em química. Transferiu-se para a Universidade de Columbia para estudar bioquímica, no departamento de Química Biológica. Concluiu sua tese, em 1937, com o estudo da composição de aminoácidos da elastina. Em 1938, integrou-se ao laboratório de Max Bergmann no Instituto de Pesquisas Médicas Rockefeller em Nova York. O projeto inicial de Stein com Bergmann versou sobre a análise de aminoácidos.⁴⁵

Stanford Moore (1913-1982) graduou-se na Universidade de Vanderbilt, e logo após o doutorado pela Universidade de Wisconsin, juntou-se, em 1939, ao laboratório de Max Bergmann. Moore e Stein, recém-doutores, concentraram esforços no desenvolvimento

de métodos gravimétricos para análise de aminoácidos.⁴⁵

Max Bergmann faleceu, em 1944, e seu laboratório perdeu quase todos os pesquisadores, que assumiram outras atividades. Em 1945, Moore e Stein (Figura 17) passaram a chefiar e dar continuidade ao trabalho de Bergmann, sobre a análise de aminoácidos.⁴⁵

A lealdade de Moore com a Universidade Rockefeller, onde trabalhou até o fim de sua

carreira, e a sua devoção à bioquímica, refletem-se em seu testamento, que legou seus bens à Universidade para serem usados para apoiar a pesquisa no campo da bioquímica.⁴⁵

O trabalho de Stein e Moore com a elucidação da sequência de aminoácidos da enzima ribonuclease, bem como de sua estrutura espacial, levou ambos a dividirem com Christian B. Anfinsen o Prêmio Nobel de Química de 1972.⁴⁶

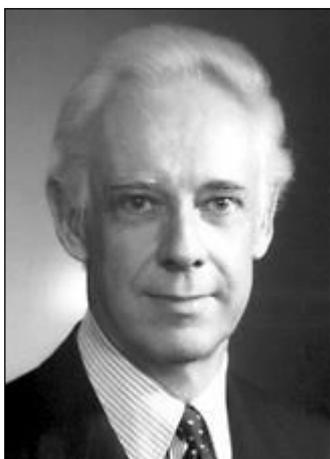


Figura 17. Stanford Moore (esquerda) e William Howard Stein (direita). Reprodução da ref. 46 com autorização. Copyright© 2014 The Nobel Prize

A produção bibliográfica da dupla de cientistas do Laboratório do Instituto Rockefeller de Pesquisas Médicas de Nova York e, conseqüentemente, a enorme contribuição à comunidade científica pode ser atestada com a apresentação de seus principais artigos.

10.2. A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de amido

Uma solução para a separação de misturas complexas de aminoácidos foi apresentada por Synge. Ele realizou experimentos qualitativos de separação em colunas cromatográficas usando amido como adsorvente, Synge demonstrou a possibilidade de fracionamento de misturas em quantidades suficientes para permitir

análises posteriores por técnicas convencionais. O procedimento aparentemente poderia ser utilizado também de modo quantitativo para a análise de aminoácidos.⁴⁷ Este foi o objetivo do trabalho de Stein e Moore, cujos primeiros resultados foram publicados em 1948.

Neste estudo⁴⁷, Stein e Moore aplicaram misturas de aminoácidos em colunas de amido, coletaram uma série de pequenas frações do efluente com volume conhecido, e analisaram quantitativamente as frações. Os resultados obtidos permitiram a construção de curvas de concentração de efluente, que revelaram a separação e a eficiência da coluna de amido. A Figura 18 apresenta uma destas curvas, o eixo x representa a fração coletada (volume de efluente coletado), e o eixo y a concentração determinada

espectrofotometricamente pelo método de reação colorimétrica com ninidrina.

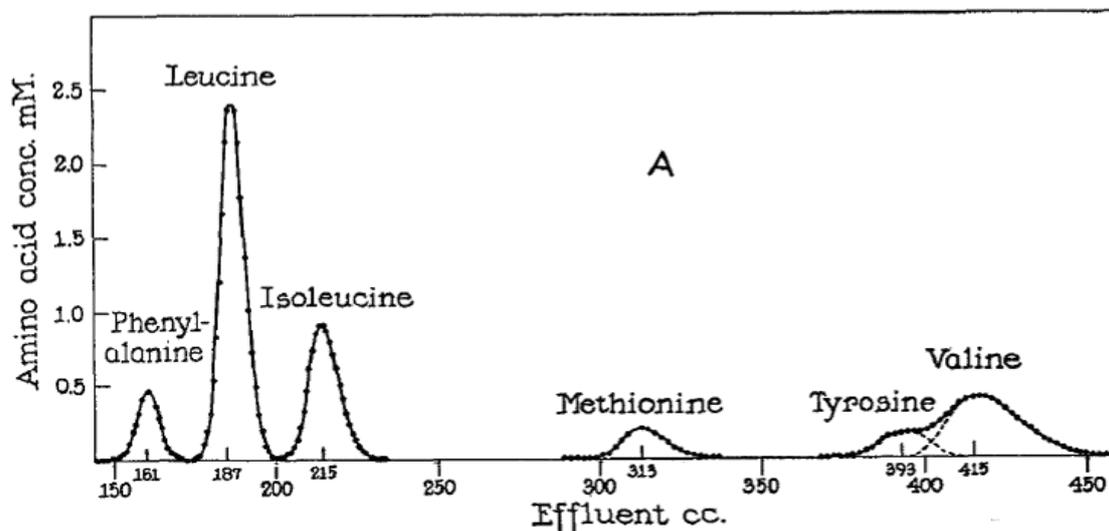


Figura 18. Curva de uma separação de aminoácidos em coluna de amido. Reprodução da ref. 47 com autorização. Copyright© 1948 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

As colunas cromatográficas eram preparadas com amido de batatas, tinham aproximadamente 30 centímetros de comprimento por 0,9 cm de diâmetro.

Inicialmente, as frações do efluente eram coletadas manualmente. No entanto, devido ao grande número de experimentos, foi desenvolvida uma máquina capaz de coletar automaticamente as frações.⁴⁷ As frações eram coletadas em tubos de ensaio colocados em um rack contendo até 320 tubos dispostos em círculos concêntricos. Cada gota de efluente da coluna atravessava um feixe de luz, e, deste modo, o mecanismo contava automaticamente o número de gotas. Ao chegar ao número de gotas estabelecido, 20 a 40 dependendo do solvente utilizado, o mecanismo zerava o contador e acionava um motor que fazia o rack girar para o próximo tubo. Dessa maneira era possível coletar frações de 0,5 mL.

Para realizar uma corrida típica, como a da Figura 18, era necessária a operação contínua

do mecanismo durante aproximadamente 4 dias.

A fim de padronizar e aumentar o fluxo do solvente através de suas colunas de amido, Stein e Moore adaptaram uma seringa ao topo da coluna para otimização do fluxo e melhorar a resolução dos picos.

A repetitividade dos experimentos de Moore e Stein era de aproximadamente 3%, a recuperação para aminoácidos individuais era de 98 a 99%, valores que podem ser considerados incríveis devido ao material utilizado, em especial a fase estacionária.

No mesmo volume da revista em que foi publicado o artigo sobre a separação de aminoácidos em colunas de amido, Stein e Moore publicaram um segundo artigo descrevendo a otimização do método de detecção de aminoácidos com a reação de derivatização com ninidrina.⁴⁷

A preocupação era agora com o método de detecção dos aminoácidos presentes no efluente da coluna de separação. O método

deveria ser simples, rápido, sensível e capaz de detectar peptídeos presentes em hidrolisados de proteínas e fluidos biológicos.

Existiam dois métodos colorimétricos na época para derivatização de aminas, de modo que o escolhido foi o da reação com ninidrina (Figura 19), que já havia, no passado, sido extensivamente estudado. O método era bastante sensível para reações com α -aminoácidos, no entanto, os resultados se mostravam pouco repetitivos devido à

instabilidade do derivado formado. A presença de oxigênio do ar no meio de reação era o motivo desta degradação. Moore e Stein desenvolveram um meio de proceder à reação em tubos evacuados. Desse modo, a relação entre a cor desenvolvida e a concentração dos aminoácidos era mais linear. A adição de um agente forte de redução ao meio de reação impediu a oxidação.⁴⁸

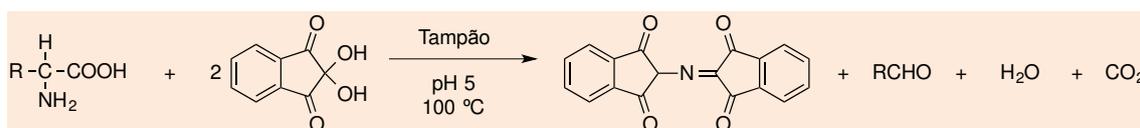


Figura 19. Reação de derivatização de α -aminoácidos com ninidrina

Moore e Stein realizaram extensivos estudos com diversos aminoácidos a fim de determinar os efeitos de variações de pH, temperatura, tempo de reação e concentração dos reagentes.

Como a quantidade de frações coletadas sempre era grande, Moore e Stein tentaram ao máximo mecanizar e automatizar o procedimento. Para realizar as reações com ninidrina, racks de cubetas de espectrofotômetro eram adaptados em banhos de aquecimento, sistemas com pipetas adaptadas a sistemas de vácuo eram alimentadas por frascos de reagentes com atmosfera modificada para evitar a presença de oxigênio.

Como conclusões de seus experimentos, Moore e Stein definiram as condições ótimas da reação de ninidrina: “A reação é conduzida em pH 5 e a 100 °C. A absorvância máxima do produto azul da reação é em 570 nm. A exatidão, para aminoácidos individuais é de 2%. O procedimento foi mecanizado de modo a permitir a análise de um grande número de amostras em rotina”.⁴⁸

Em 1949, Moore e Stein continuaram as publicações com os resultados de suas pesquisas de separação de aminoácidos em colunas de amido. Eluições em modo gradiente foram estabelecidas de modo a melhorar a resolução e reduzir o tempo de análise, que poderia chegar a 7 dias. Os cuidados com a contaminação dos tubos coletores de frações são discutidos no artigo, em especial contaminações com amônia e resíduos de análises anteriores.

Para ajustar o pH das frações coletadas, os pesquisadores adaptaram uma bureta ao coletor automático de frações, de modo que no decorrer da coleta as amostras eram automaticamente neutralizadas com solução de NaOH.⁴⁹

Ainda em 1949, Stein e Moore publicam outro artigo com os resultados da análise dos aminoácidos de duas proteínas de plasma bovino⁵⁰. O cromatograma da Figura 20 traz a separação dos aminoácidos de uma amostra de hidrolisado de uma dessas proteínas.

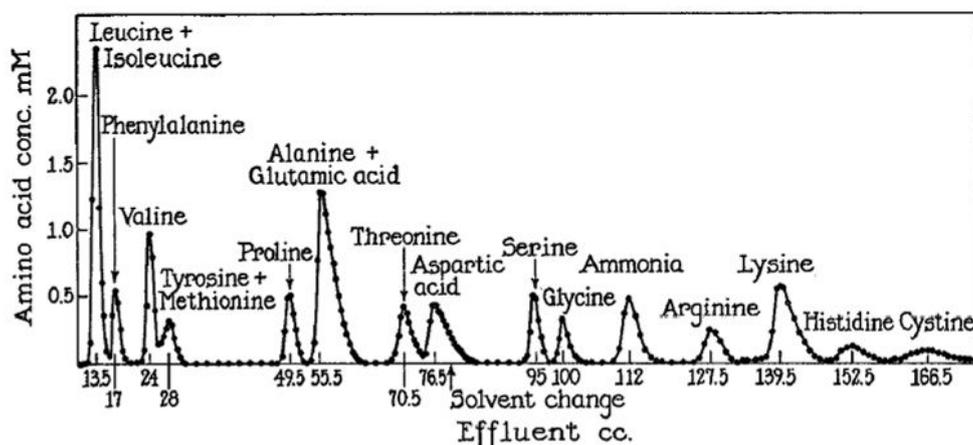


Figura 20. Fracionamento cromatográfico de hidrolisado de albumina de soro bovino. Fase móvel: 1:2:1 álcool *n*-butílico, álcool *n*-propílico e HCl 0,1 N e 2:1 álcool *n*-propílico e HCl 0,5 N. Coluna: 0,9 x 30 cm e aplicação de equivalente a 2,5 mg de proteína hidrolisada. Reprodução da ref. 49 com autorização. Copyright© 1949 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

A pequena quantidade de amostra aplicada na coluna cromatográfica permitiu a Stein e Moore reduzirem as quantidades necessárias de amostra a ser hidrolisada, trabalhando em microescala de 25 a 50 mg de amostra, 10 vezes menos que a quantidade tradicionalmente utilizada.⁵⁰

11. A separação cromatográfica de aminoácidos em colunas de troca iônica

11.1. A contribuição de Partridge

Paralelamente ao trabalho de Moore e Stein, com as separações de aminoácidos em colunas de amido, muitos pesquisadores estavam utilizando resinas de troca iônica na separação de eletrólitos orgânicos. Em especial, o pesquisador S. M. Partridge, do laboratório de pesquisa em bioquímica e biofísica da Universidade de Cambridge, na Inglaterra, que publicou de 1949 a 1952 uma série de trabalhos sobre o assunto. A série de trabalhos contém oito publicações com os

seguintes títulos:

Cromatografia de deslocamento em resinas sintéticas de troca iônica:

- Parte 1 – Separação de bases orgânicas e aminoácidos usando resinas de troca catiônica;⁵¹
- Parte 2 – Separação de ácidos orgânicos e aminoácidos ácidos pelo uso de resinas de troca aniônica;⁵²
- Parte 3 – Fracionamento de um hidrolisado de proteína;⁵³
- Parte 4 – Isolamento de glucosamina e histidina de um hidrolisado proteico;⁵⁴
- Parte 5 – Separação de aminoácidos básicos;⁵⁵
- Parte 6 – Efeito da temperatura na ordem do deslocamento;⁵⁶
- Parte 7 – Separações usando uma resina básica forte;⁵⁷
- Parte 8 – Um método sistemático para a separação de aminoácidos.⁵⁸

A metodologia usada por Partridge consistia na aplicação da cromatografia de deslocamento, desenvolvida por Tiselius e

Claesson, usando como fase estacionária resinas de troca iônica. A solução com a mistura a ser separada era introduzida na coluna e os componentes separados pela introdução de uma fase móvel contendo uma base ou um ácido mais fortemente adsorvido pela resina. Os componentes da mistura eram então sucessivamente deslocados e eluíam da fase estacionária. Como os componentes da mistura não formavam bandas claramente visualizadas, técnicas analíticas contínuas para medir as alterações do efluente da coluna eram necessárias para

determinações qualitativas e quantitativas. Métodos para este propósito já haviam sido sugeridas por Claesson,⁵⁹ e os principais deles para esta medição eram a utilização de um eletrodo para medir continuamente a condutividade elétrica ou o pH do efluente, ou, ainda, a titulação de sucessivas pequenas alíquotas. A Figura 21 mostra o esquema do acoplamento de um eletrodo à saída da coluna para determinação da condutividade elétrica ou o pH do efluente de maneira contínua.⁵¹

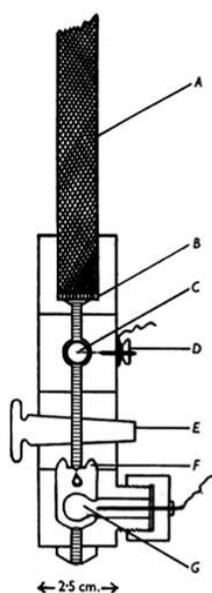


Figura 21. Acoplamento de eletrodos para medição da condutividade elétrica e pH do efluente da coluna cromatográfica. (A) Fase estacionária; (B) Disco perfurado com lã de vidro; (C) Célula com eletrodos para condutividade elétrica; (D) Terminais dos eletrodos; (E) Regulagem de fluxo; (F) Célula do eletrodo e (G) Potenciômetro de pH. Reprodução da ref. 51 com autorização. Copyright© 1949 The Biochemical Journal

Em dezembro de 1945, a companhia americana DOW lançou uma resina de troca catiônica com alta capacidade e com excelente estabilidade química, comercialmente disponível com o nome de DOWEX 50. Em 1948, o uso da resina DOWEX 50 se popularizou, especialmente no pré-tratamento de água de uso industrial. Com base polimérica sulfonada, a resina tem aplicação na desmineralização de água, fornecendo uma capacidade de

aproximadamente o dobro das resinas então disponíveis no mercado. Além disso, podiam ser utilizadas em larga faixa de pH e sob temperaturas de até 100°C. Sua forma esférica perfeita permitiu melhor empacotamento e, conseqüentemente, melhor uniformidade de fluxo e aumento de sua capacidade. Além disso, estavam disponíveis partículas uniformes de até 0,04 μm .⁶⁰

11.2. Moore e Stein adotam as colunas de resinas de troca iônica

O desenvolvimento de separações cromatográficas de aminoácidos usando resinas de troca iônica como fase estacionária, teve por objetivo a substituição das separações em colunas de amido. As colunas de amido, até então estudadas em detalhes por Moore e Stein, apresentavam desvantagens, como a necessidade de dessalinização de fluídos com alta concentração de sais, como os fluídos biológicos. A utilização da resina DOWEX 50 mostrou-se livre desses problemas.⁶¹

Moore e Stein iniciaram estudos para a otimização da separação quantitativa de aminoácidos em resina de troca iônica. No entanto, ao contrário de Partridge, insistiram na eluição em detrimento da cromatografia de deslocamento. Para isto, utilizaram eluição com soluções tampões com pH progressivamente aumentados. Ao contrário do deslocamento, os tampões são menos agressivos que a eluição com ácidos e causam menos interferência no método de detecção com a reação com ninidrina. A separação de misturas de aminoácidos se mostrou mais favorável em coluna de troca iônica comparativamente às de amido anteriormente utilizadas. A análise se mostrou ainda duas vezes mais rápida com as colunas de troca iônica, tendo a separação completa dos aminoácidos em 5 dias.⁶¹

Em 1952, Moore e Stein publicaram um artigo onde apresentaram a separação de aminoácidos em uma escala maior com fins preparativos. Eles usaram colunas bem maiores que as até então construídas, e a fase estacionária utilizada continuou sendo a

resina DOWEX 50. Deste modo, foi possível o isolamento de misturas com até 300 mg de aminoácidos, de maneira quantitativa e com obtenção de aminoácidos isolados em quantidades relativamente grandes. Foram utilizadas colunas de 7,5 cm de diâmetro e até 120 cm de comprimento. A Figura 22 apresenta o esquema de montagem dessas colunas. Foi também desenvolvido um sistema para inserção de eluente via frasco pressurizado. Dessa maneira, era possível controlar e manter o fluxo constante através da coluna com o ajuste da pressão do ar comprimido aplicado dentro do frasco.⁶¹ Sistema semelhante foi desenvolvido por Tswett (item 5.4), que mantinha o frasco pressurizado com a utilização de sistema manual de bombeamento de ar. Claesson (1948) também desenvolveu sistema de pressurização com a utilização de um êmbolo no recipiente de armazenamento de fase móvel (item 9).

As colunas preparadas com resina de troca iônica ainda tinham a vantagem de poderem ser reutilizadas, bastando reequilibrá-las com a fase móvel inicial utilizada para a separação.

Utilizando as colunas de 7,5 cm de diâmetro, Moore e Stein conseguiram isolar não apenas aminoácidos, mas, também, isolaram a enzima pancreática ribonuclease, chegando a obter 45 mg de enzima pura.⁶³ A medida que Moore, Stein e colaboradores avançavam nos estudos bioquímicos, a metodologia de análise cromatográfica avançava na mesma velocidade de suas descobertas. Após o isolamento cromatográfico da ribonuclease, a próxima etapa foi a determinação da composição de seus aminoácidos.⁶⁴

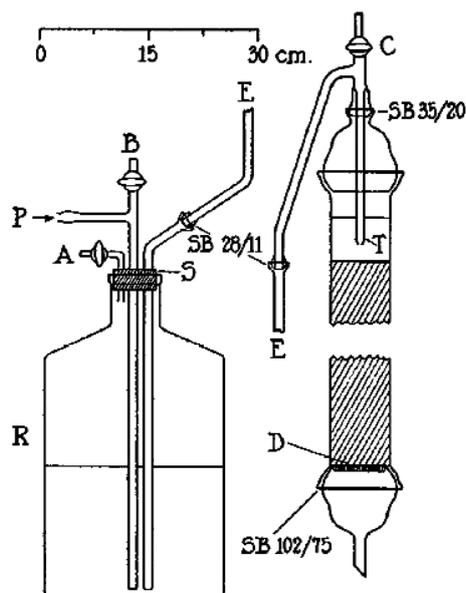


Figura 22. Diagrama para acoplamento de frasco de eluente pressurizado para alimentação da coluna de separação. Reprodução da ref. 64 com autorização. Copyright© 1954 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

O método de detecção do efluente das colunas de resina iônica foi melhorado. Ele ficou mais rápido, menos sensível a interferências e mais sensível, possibilitando a completa resolução de uma mistura de 50 aminoácidos e pequenos peptídeos.⁶⁵ A eluição era feita com uma contínua mudança na força iônica e no pH da fase móvel, porque dessa maneira, não era mais necessária a troca manual da fase móvel e não ocorriam variações bruscas na composição da fase móvel com conseqüente perda de resolução cromatográfica. Com essas mudanças os picos tornaram-se mais intensos, finos e simétricos. A temperatura da coluna também era controlada e alterada durante a análise para melhorar a separação. Diversas adaptações e conexões foram necessárias para adaptar as colunas e os diversos frascos de solventes das fases móveis e das soluções de regeneração das resinas. Uma análise completa demorava uma semana nas

condições estabelecidas.⁶⁶

11.3. Aplicações analíticas da cromatografia em colunas de troca iônica

Moore e colaboradores determinaram a composição de aminoácidos do leite materno humano, o que representou um padrão de referência para a nutrição infantil.⁶⁷ A composição de aminoácidos livres do plasma humano também foi objeto de estudo deste autor e de seus colaboradores. A Figura 23 apresenta um cromatograma completo, ou curva de efluente como denominado pelos autores. O cromatograma inclui, além da identificação dos picos, todas as alterações na fase móvel, volume de eluição e as variações de temperatura aplicadas às colunas.⁶⁸

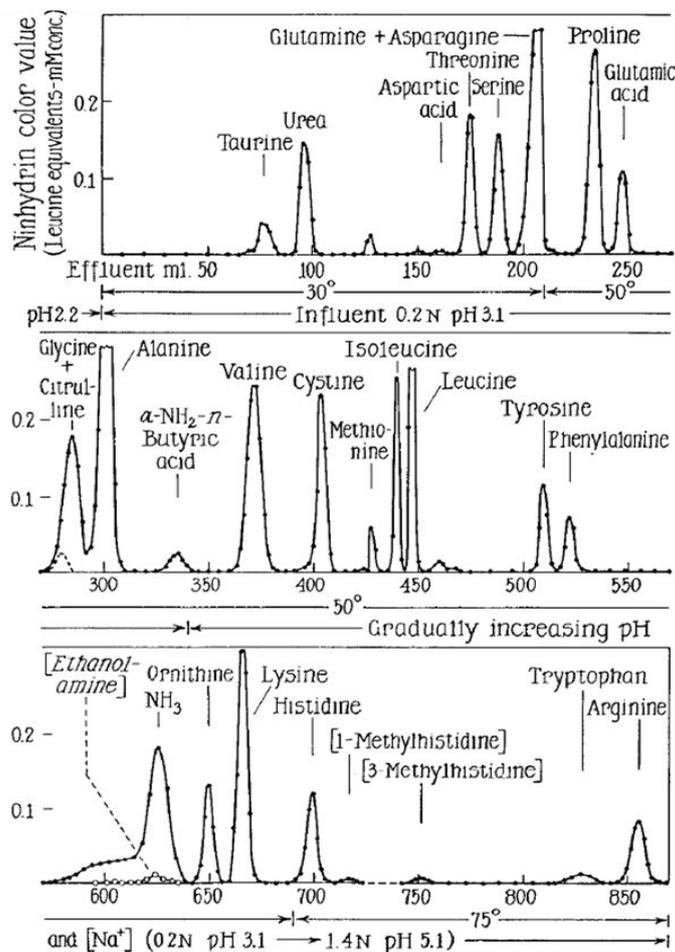


Figura 23. Curva de efluente de uma determinação de aminoácidos livres no plasma de sangue humano. Reprodução da ref. 68 com autorização. Copyright© 1954 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

A cada dia o método cromatográfico para determinação de aminoácidos ganhava mais adeptos e os resultados de sua aplicação aumentavam. A separação em colunas de troca iônica levou a descoberta e ao isolamento de dois novos constituintes, a 3-metilhistidina e a tirosina-O-sulfato.⁶⁹⁻⁷¹

Moore, Stein e colaboradores voltaram-se, a partir de 1956, para o estudo estrutural da enzima ribonuclease, enzima que já havia sido objeto de seus estudos. Os trabalhos agora se centravam em determinar a sequência de aminoácidos de peptídeos formados por hidrólise parcial da ribonuclease. Os peptídeos formados eram isolados por cromatografia em coluna de troca iônica e hidrolisados para identificação de seus aminoácidos.⁷²⁻⁷⁴

12. O cromatógrafo de Moore e Stein

Após uma série de publicações com os resultados de investigações bioquímicas, que se utilizaram da cromatografia em resinas de troca iônica para determinações de aminoácidos e peptídeos hidrolisados de enzimas, a dupla de pesquisadores voltou a relatar a evolução da metodologia alcançada durante suas pesquisas. São de 1958 duas publicações que apresentam os detalhes do método e da instrumentação construída.

A primeira destas publicações apresentou as melhorias dos procedimentos para a separação de aminoácidos em resinas de

poliestireno sulfonado. A utilização de resinas com partículas menores resultou em maior resolução cromatográfica, o que permitiu a eluição em fluxos mais altos. A escolha apropriada das fases móveis também simplificou a operação. A análise completa de hidrolisados proteicos era realizada agora em 48 horas com a metodologia de coleta automática de frações, e em 24 horas com equipamento de registro automático.⁷⁵

Eram necessárias duas colunas para a separação de todos os aminoácidos, uma com resina Amberlite IR-120 de 150 cm, e outra com resina DOWEX-50X8 de 15 centímetros. Ambas as colunas podiam ser utilizadas repetidamente em temperatura fixa de 50°C. Apenas duas soluções tampão foram usadas, sendo necessária apenas uma mudança de eluente durante a análise. Dessa maneira, foi possível obter uma linha base muito mais estável ao longo da análise.⁷⁵

O uso de resinas com tamanho de partículas menores aumentou o fluxo da fase móvel para valores superiores a 30 mL/hora. Para isso, foi necessária a utilização de uma bomba posicionada entre a coluna e o frasco do tampão, ao invés da pressurização dos frascos de eluente com ar. As tubulações e conexões também foram trocadas por material capaz de suportar as maiores pressões geradas pelo sistema de bombeamento.⁷⁵

A segunda publicação,⁴⁴ no mesmo volume do periódico da publicação anterior,

trouxe o diagrama do cromatógrafo desenvolvido e construído por Moore e Stein (Figura 24). O equipamento construído foi fruto da necessidade de um método preciso, rápido e menos trabalhoso. A análise completa de aminoácidos era agora realizada em apenas 24 horas, com grau de automação que exigia atenção mínima do operador, quando comparada ao método até então usado.

O artigo continha explicações detalhadas de todos os componentes utilizados e/ou construídos, além dos procedimentos para sua operação que certamente são até os dias de hoje excelentes orientações para operadores dos atuais sistemas cromatográficos.

Até então, a identificação dos aminoácidos separados em colunas de troca iônica era feita através da coleta de pequenas e numerosas frações de efluente da coluna. Posteriormente, adicionava-se uma solução de ninidrina e determinava-se em um espectrofotômetro a absorvância de cada fração. No novo equipamento a solução de ninidrina era bombeada constantemente e misturada ao fluxo de efluente da coluna. A reação ocorria em uma bobina de teflon colocada em um banho de aquecimento. Após a reação, o fluxo deste reator passava através de um fotômetro construído especialmente para determinar a absorvância do efluente, e a ele estava conectado um registrador de papel.

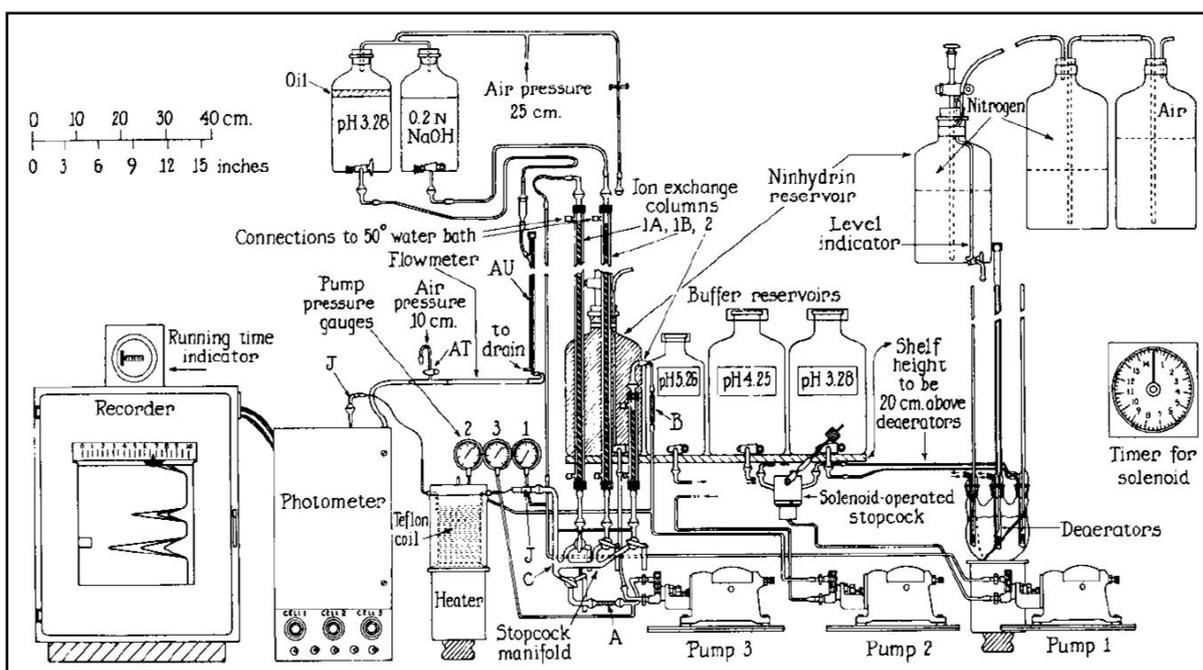


Figura 24. Diagrama do cromatógrafo construído por Moore e Stein. Reprodução da ref. 44 com autorização. Copyright© 1958 American Chemical Society

12.1. Sistemas de bombeamento

Para a garantia de um método preciso e contínuo, o eluente e a solução de ninidrina usada para a reação colorimétrica, deveriam ser bombeados de forma constante e controlada. Para a construção do equipamento ilustrado na Figura 24, foram utilizadas três bombas com pistões de aço. Duas para o bombeamento das soluções tampão de eluição e a outra para a solução de ninidrina. Cada bomba estava equipada com duas válvulas de retenção (*check valves*), uma na alimentação do pistão e outra na saída. O fluxo podia ser regulado com um parafuso de regulagem do curso do pistão. Os tampões eram bombeados a 30 mL/h e a ninidrina a 15 mL/h.

Os detalhes de conexões, tubulações e marcas de todo o material utilizado estão no artigo. Os autores detalharam toda a operação e os cuidados a serem tomados para o correto funcionamento das bombas. Especial atenção foi dada ao problema de formação de bolhas de ar, chamada a atenção para a remoção total do ar dos

pistões das bombas, e para se evitar a inserção de ar através do término da fase móvel ou do sistema de deaeração. A principal causa de variações de fluxo era a inserção de ar através das linhas de eluente ou conexões. A pressão de cada linha de saída das bombas era monitorada com o auxílio de um manômetro com escala de 0 a 60 psi.

Para o correto funcionamento das bombas, era necessária uma pressão mínima de resistência na válvula de saída. A coluna de 150 cm apresentava resistência suficiente para gerar a pressão necessária na bomba 1. No entanto a coluna de 15 cm, alimentada pela bomba 2 e a bomba 3 da solução de ninidrina necessitavam uma resistência maior. Para atingir esta resistência, dois filtros de lã de vidro eram colocados nas linhas de saída destas bombas, indicados na Figura 24 pelas letras A e B. Estes filtros geravam aproximadamente 25 psi de pressão no sistema, combinados com a resistência das colunas, a pressão total chegava a 40 psi.

12.2. Reservatórios para as fases móveis

Para o armazenamento das soluções tampão, eram utilizadas garrafas de 2 L de capacidade para a solução de pH 5,26 e de 4 L para as soluções de pH 4,25 e 3,28. As saídas eram posicionadas na base do frasco conectadas a tubos plásticos flexíveis. As garrafas eram mantidas em uma estante posicionada 20 cm acima do nível dos desaeradores e 30 cm acima das bombas, pois elas precisavam de pressão positiva na entrada para correto funcionamento. No topo dos frascos era colocado um tubo contendo ácido cítrico para absorver a amônia presente no ar, que ia para os frascos à medida que o líquido era bombeado. Dessa maneira, evitava-se que houvesse reação da ninidrina com a amônia. Cuidado especial era tomado para não posicionar as garrafas diretamente sobre as partes eletrificadas do instrumento.

Dois frascos de 2 L contendo solução de NaOH 0,2 N e solução tampão pH 3,28 eram posicionadas 25 cm acima do nível do topo das colunas. Estas soluções eram utilizadas para a regeneração da resina de troca iônica após o término da corrida cromatográfica. As linhas plásticas eram adaptadas diretamente às colunas.

O frasco para a solução de ninidrina continha um tubo externo para visualização do nível da solução. Isto era necessário porque o frasco tinha de ser envolvido com fita adesiva preta para impedir a entrada de luz. O topo do frasco era fechado com uma rolha de borracha com um tubo para a saída da solução e uma conexão para entrada de nitrogênio, já que a solução de ninidrina não podia ficar exposta ao ar.

O tubo da linha da solução de ninidrina continha uma seção recheada com lã de vidro não compactada, tendo como função a retenção de qualquer partícula em suspensão. A solução deveria passar facilmente, apenas com a força da gravidade, através da seção de filtração a fim de não prejudicar a alimentação da bomba. A seção de filtração era periodicamente limpa para

remoção de partículas evitando a restrição do fluxo.

12.3. Sistema de deaeração das fases móveis

Como o fluxo do eluente era misturado ao fluxo da ninidrina e passava pelo reator, aquecido a 100°C, havia formação de bolhas provenientes do ar dissolvido na fase móvel. Para evitar este inconveniente, que interferia no sistema de detecção, foi desenvolvido um sistema de deaeração. A remoção do ar era realizada através do aquecimento da fase móvel antes do sistema de bombeamento, assim o ar dissolvido era liberado através de um longo tubo que funcionava como condensador para os vapores.

12.4. Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas eram construídas com tubos de vidro com 0,9 cm de diâmetro. Para a construção das colunas de 150 cm, eram usados tubos de 166 cm de comprimento com uma placa sinterizada de porosidade média com 3 mm de espessura para reter a resina de troca iônica. As colunas menores eram construídas de maneira similar, variando apenas o tamanho do tubo de vidro, que era de 25 cm. Os tubos de vidro eram envoltos em uma camisa de vidro para circulação de água proveniente de banho de aquecimento, a fim de controlar a temperatura durante a separação cromatográfica.

Duas colunas de 150 cm eram mantidas no sistema. Dessa maneira, era possível manter uma em uso enquanto a segunda coluna era regenerada para a próxima análise. As colunas estão identificadas na Figura 24 com os rótulos 1A e 1B para as colunas de 150 cm e 2 para a coluna de 15 cm.

As colunas eram conectadas ao fluxo das bombas pela extremidade superior, e na extremidade inferior havia um sistema com 3

válvulas em vidro para seleção manual da coluna em uso, e outra para misturar o fluxo do efluente da coluna com o fluxo de solução de ninidrina vindo da bomba 3. O diâmetro interno desses tubos de vidro era de 1 mm. As torneiras deste sistema eram presas com cliques metálicos para suportar a pressão do sistema, que era de aproximadamente 7 psi durante a operação neste ponto.

12.5. Reator para derivatização com ninidrina

O fluxo da mistura do efluente da coluna e da solução de ninidrina proveniente da válvula de vidro era conduzido para uma bobina construída com um tubo de teflon de 29 m de comprimento e 0,7 mm de diâmetro interno. A bobina era mantida submersa dentro de um banho de aquecimento a 100°C. Como o diâmetro interno do tubo de teflon variava de lote a lote, o volume interno da bobina era determinado gravimetricamente. Para isso o tubo vazio era pesado e comparado com sua massa quando cheio de água. O valor determinado era

utilizado para calcular o comprimento necessário do tubo com 11,25 mL de solução, volume necessário para garantir a correta mistura da solução de ninidrina com o efluente em um fluxo total de 45 mL/h, obtendo assim um tempo de residência no banho de aquecimento de 15 minutos. Esse era o tempo necessário para o desenvolvimento máximo de cor da reação da ninidrina com os aminoácidos.

12.6. Fotômetro para detecção em linha

Depois de passar pelo reator, o fluxo de efluente era direcionado diretamente a um fotômetro. O fotômetro utilizado foi projetado e construído no próprio Instituto Rockefeller e, sempre que possível, eram utilizados componentes disponíveis comercialmente. A montagem consistia em três fotômetros individuais em uma mesma unidade, cada um com sua própria fonte de luz, lente, filtro, célula de absorção e célula fotovoltaica. A montagem e o detalhe de uma célula encontram-se na Figura 25.

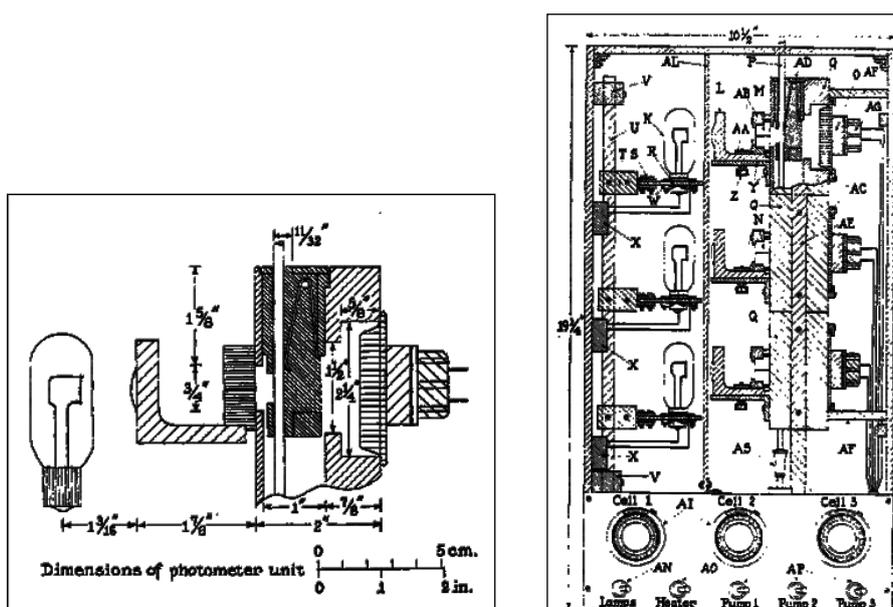


Figura 25. A esquerda detalhe da montagem de uma célula de detecção e a direita a montagem de três células em série. Reprodução da ref. 44 com autorização. Copyright© 1958 American Chemical Society

As três células foram montadas de modo a se obter todos os dados necessários com apenas uma análise. Duas células tinham filtros transmitindo em comprimento de onda máximo de 570 nm, e a outra em 440 nm. Com essa montagem, era possível determinar a absorção no comprimento máximo dos derivados azuis de aminoácidos (570 nm) e dos derivados amarelos formados pela prolina e hidroxiprolina (440 nm). A terceira célula, com filtro em 570 nm, diferia da outra pelo tamanho do caminho ótico, que sendo mais estreito permitia a detecção de altas concentrações de derivados de aminoácidos, aumentando assim a faixa de trabalho do detector.

A vida útil das lâmpadas era de 12 meses para as operavam em 570 nm e de 6 meses para a usada em 440 nm.

Ao sair do fotômetro, o efluente era então direcionado para um sistema de medição de fluxo, que, muito engenhoso, consistia em um tubo com uma seção que permitia a entrada de uma bolha de ar. A velocidade da bolha inserida era a mesma do fluxo do líquido, assim sendo, o tempo de viagem desta bolha ao longo de um tubo com marcas permanentes era cronometrado de modo

que o valor do fluxo podia ser determinado. Com o correto comprimento do tubo era possível calibrar o medidor de fluxo de modo que uma bolha que levasse 45 s para atravessá-lo corresponderia a um fluxo de 45 mL/h. O aparato pode ser visualizado na Figura 24.

12.7. Registrador automático

O registrador utilizado comercialmente disponível consistia em um medidor de corrente de três pontos com velocidade de papel de 7,6 cm/h. Dessa maneira, os dados dos três fotômetros individuais eram impressos simultaneamente em cores diferentes, sendo que a cada 4 s um valor de leitura era registrado através de um ponto. Os pontos eram posicionados tão próximos que o resultado final consistia em três linhas simultâneas de cores diferentes (Figura 26). O papel utilizado continha escalas vertical e horizontal. A escala horizontal podia ser lida diretamente como absorvância, e, desde que mantida a velocidade do papel e o fluxo do efluente, cada linha da escala horizontal representava 2 mL do efluente da coluna.

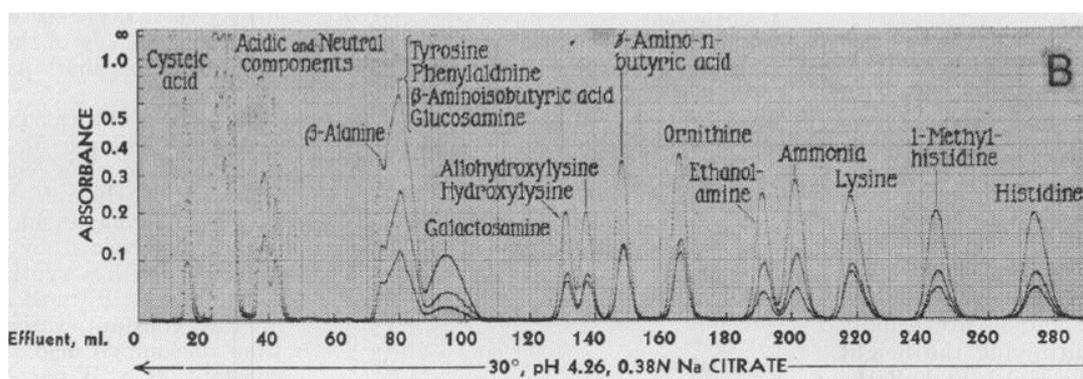


Figura 26. Porção de um registro em papel de uma análise de aminoácidos realizada com o aparato de Moore e Stein. Reprodução da ref. 44 com autorização. Copyright© 1958 American Chemical Society

13. Resumo sobre as contribuições de Stein e Moore para a cromatografia líquida

A genialidade inventiva da dupla de cientistas, juntamente com a escolha do objeto de estudo, os aminoácidos, levou à melhoria da separação cromatográfica e à automação de todo o processo. Esta automação resultou no primeiro sistema

cromatográfico projetado e construído. Totalmente adaptado às necessidades e sem qualquer proteção intelectual, este sistema é o modelo mais completo desenvolvido e, certamente, serviu de inspiração para muitos pesquisadores e empresas de instrumentação científica. A Figura 27 mostra os dois pesquisadores ao lado do sistema cromatográfico que conceberam e utilizaram como a principal ferramenta de trabalho ao longo de suas brilhantes carreiras científicas.

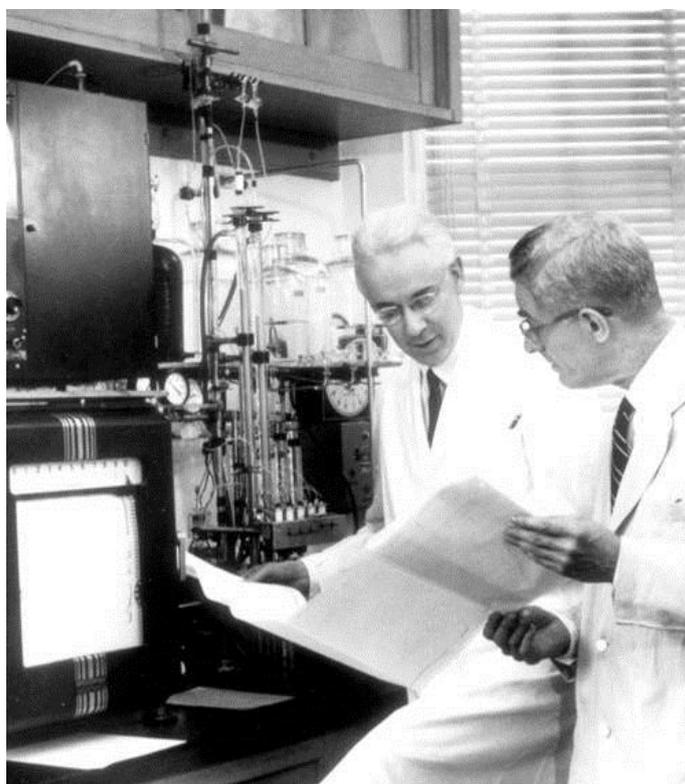


Figura 27. Stanford Moore e William Stein ao lado de seu sistema cromatográfico em 1965. Copyright© 1958 The Rockefeller University

14. “Cromatograma” do tempo (a história da cromatografia)

A Figura 28 apresenta um diagrama com um resumo gráfico dos principais eventos da história da cromatografia, além das fotos dos responsáveis pelas descobertas e/ou invenções.

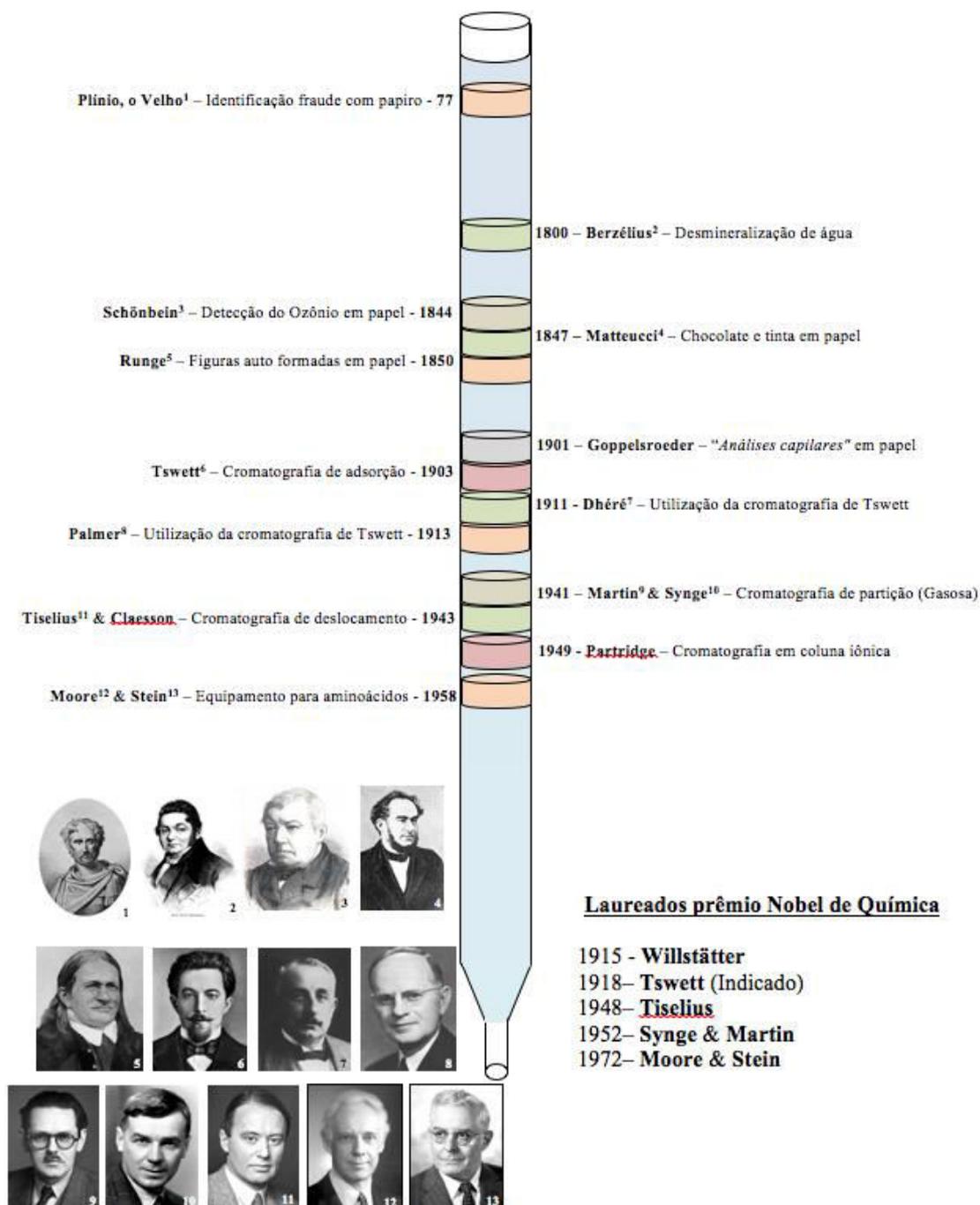


Figura 28. “Cromatograma” do tempo (a história da cromatografia). Reprodução da ref. 76

15. A instrumentação comercial

No início, os sistemas cromatográficos eram chamados de cromatógrafos líquidos de alta pressão, isto porque os líquidos apresentam viscosidades muito superiores aos gases e, conseqüentemente, altas pressões eram necessárias para mover o

líquido através da coluna quando comparado aos cromatógrafos gasosos. Logo, o termo pressão foi substituído por eficiência, e até os dias de hoje é utilizado.²⁶

Como a instrumentação não existia comercialmente em 1968, vários autores descreveram em detalhes como modificar e montar um equipamento de cromatografia líquida com componentes disponíveis. Em

1969, durante o 5º Simpósio sobre avanços em cromatografia, uma sessão especial sobre CLAE foi organizada e algumas companhias apresentaram suas instrumentações. Em 1971, um encontro sobre CLAE foi organizado em Wilmington, nos Estados Unidos. Desse surgiu o primeiro livro sobre CLAE.²⁶

Como os preços dos sistemas cromatográficos em fase líquida eram muito superiores aos dos já difundidos cromatógrafos em fase gasosa, era comum usuários referirem-se à sigla em inglês “HPLC” como sendo “High Price Liquid Chromatography”, em alusão ao nome que mudara de “Pressure” para “Performance”, mudança que ainda era motivo de discussão e confusão. Mais tarde, com a difusão dos sistemas cromatográficos, a discussão tomou rumos de anedota, não era incomum ouvir que a palavra correta para a letra “P” da sigla era “Patience”. O que pode ser explicado pela dificuldade de adaptação dos usuários de cromatógrafos gasosos, que ao iniciarem com os novos sistemas de CLAE deparavam-se com vazamentos de solventes, bolhas de ar, e com o fato da fase móvel agora não ser mais inerte, interferindo ativamente na separação das substâncias. Não bastasse, ainda existia a necessidade de um sistema de bombeamento do solvente através da coluna, o que não existe em cromatógrafos gasosos pelo fato da fase gasosa apresentar-se pressurizada em cilindros. A adaptação exigia muita dedicação e, certamente, muita paciência dos usuários.

16. A evolução das fases estacionárias para cromatografia líquida

Com o início da utilização dos sistemas cromatográficos de alta pressão, nos anos de 1960, eram utilizadas como fases estacionárias partículas de sílica porosa irregulares de 40 a 50 μm com grande distribuição de tamanho. As separações, nessas condições, eram chamadas de

cromatografia em fase normal. Tais partículas de sílica eram obtidas através de técnicas de moagem e separação em peneiras. Com o passar dos anos, a técnica de preparo das partículas foi evoluindo de modo que foram disponibilizadas partículas na faixa de 30 a 40 μm , em seguida surgiram as de 15 a 20 μm , e por fim as de 10 a 3 μm , que eram preparadas com a precipitação da sílica, a partir de uma solução de silicato.⁷⁷

No final da década de 1960 foram desenvolvidas as partículas de sílica superficialmente porosas denominadas partículas peliculares, com aproximadamente 40 μm de tamanho. Tais partículas consistiam de um núcleo sólido não poroso revestido com uma camada de 1 μm de sílica porosa. O intuito dos desenvolvedores era reduzir a dispersão dos analitos ao longo da matriz porosa da fase estacionária, porque, com isso, incrementava-se a resolução cromatográfica.^{77 78}

Na década de 1970, na tentativa de ampliar a aplicação analítica das fases estacionárias, partículas de sílica foram revestidas com fina camada ativa através de partição líquido-líquido. No entanto, sérios problemas de estabilidade das fases assim construídas não permitiram a disseminação da técnica. Este método era usado com sucesso em colunas para cromatografia gasosa, onde líquidos de alta viscosidade eram depositados sobre um suporte inerte. O problema é que esta tecnologia não funcionou bem para colunas de cromatografia líquida, porque o fluxo da fase móvel acabava dissolvendo a fase estacionária alterando sua concentração no suporte, e, conseqüentemente, as separações apresentavam sérios problemas de reprodutibilidade.^{26 79} As partículas peliculares caíram em desuso após o surgimento, no mercado, de partículas esféricas porosas de 10 e 5 μm .⁷⁷

A disponibilidade de partículas de sílica esféricas de aproximadamente 10 μm e o surgimento da técnica de modificação química das fases estacionárias, em especial as fases octadecilsilano (C_{18}) e octil (C_8),

permitiram a construção de colunas robustas e de grande seletividade, denominadas de colunas de fase reversa. Passou a ser possível a injeção em meio aquoso, tendo apenas a limitação do uso de bases fortes. A evolução das fases estacionárias foi contínua e rápida. A normalização da superfície da sílica, o uso de sílica de alta pureza, a evolução das modificações químicas e procedimentos de recobrimento dos sítios polares remanescentes produziram sistemas de fase reversa robustos com excelente estabilidade e eficiência. A introdução de outros grupos funcionais ligados aumentou exponencialmente as aplicações e a popularização dos sistemas de separação. Surgiram as fases estacionárias quimicamente ligadas polares, de troca iônica, quirais, entre outras.^{26,77,78}

Em 1975, a tecnologia de empacotamento das fases estacionárias e a redução do tamanho da partícula (5 μm) aumentaram a eficiência das colunas. Em 1978, as partículas chegaram a 3 μm e, em 1990, a 1,5 μm . Com tais partículas foi possível chegar aos pratos teóricos necessários para as separações com colunas muito menores, aumentando assim a velocidade e a sensibilidade das análises. No início, as colunas tinham o tamanho padrão de 25 cm, onde se conseguia de 8.000 a 10.000 pratos teóricos por metro de coluna. Com as colunas de 3 μm , o mesmo número de pratos teóricos era alcançado com colunas de 6 cm de comprimento, o que reduziu o

tempo de análise em um fator de aproximadamente 4.²⁶

A evolução dos equipamentos e a demanda da indústria, em especial a química e a farmacêutica, de controle de qualidade cada dia mais exigente, levou os sistemas cromatográficos CLAE a se tornarem a terceira maior força, em presença nos laboratórios, perdendo apenas para balanças e pHmetros.²⁶

16.1. Colunas com partículas superficialmente porosas (*coreshell*)

As partículas superficialmente porosas, ou partículas de núcleo fundido (*Fused Core*), são baseadas nas partículas peliculares desenvolvidas na década de 1960. O seu preparo consiste na sinterização de uma partícula de sílica porosa a alta temperatura. Esse processo de fusão acaba tornando a partícula livre de poros. Na sequência, o núcleo sólido é revestido com uma fina camada de sílica porosa (Figura 29).⁷⁷

As vantagens desse tipo de partícula são a rápida transferência de massa, o que permite análises muito rápidas sem gerar altas pressões e alta resistência mecânica. Seu desempenho é competitivo com as partículas porosas de tamanho inferior a 2 μm , com a vantagem de gerarem pressões menores.⁷⁷

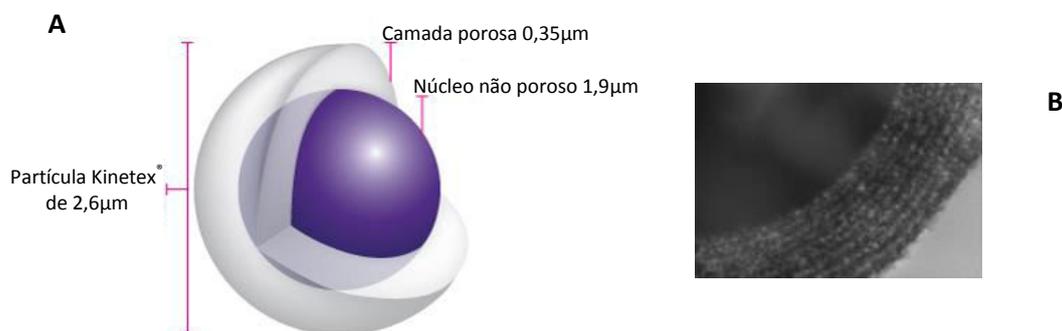


Figura 29. A- Representação de uma partícula superficialmente porosa, disponível comercialmente com o nome Kinetex® da fabricante Phenomenex®. B- Detalhe microscópico de uma partícula. Copyright© 1958 PHENOMENEX

16.2. Colunas monolíticas

As colunas monolíticas são construídas com um leito contínuo de sílica porosa no formato de um bastão ou haste. O monolito contém uma distribuição de macro e mesoporos (Figura 30) e podem ser funcionalizadas com as fases comumente utilizadas em cromatografia, como C_8 e C_{18} . A distribuição dos poros torna a coluna permeável, o que permite a utilização de fluxos de fase móvel altos e pressões baixas.⁷⁷

Uma vantagem das colunas monolíticas é que estão menos suscetíveis a entupimentos por acúmulo de partículas, justamente pelo tamanho maior dos poros. No entanto, a utilização de fluxos altos de fase móvel, até 4 mL/min, apesar de incrementar bastante a resolução cromatográfica tem por consequência alto consumo de solventes e geração de resíduos. Alguns sistemas cromatográficos ainda apresentam problemas de reprodutibilidade, já que são desenvolvidos para trabalhar sob altas pressões e a coluna monolítica gera pressões muito baixas.

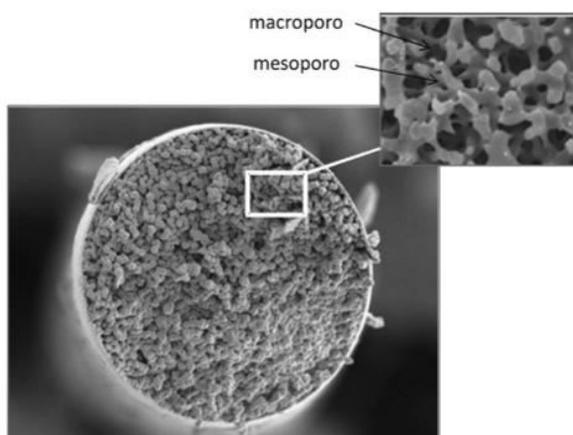


Figura 30. Corte transversal de um bastão monolítico e sua ampliação. Reprodução da ref. 77 com autorização. Copyright© 2010 Sociedade Brasileira de Química

16.3. Coluna de fase reversa C_{30}

A cromatografia em fase reversa é bem conhecida e muito utilizada para a separação dos carotenoides. No entanto, não é muito eficiente na resolução dos isômeros *cis-trans* dessas substâncias. Excelentes resultados na separação dos isômeros são conseguidos utilizando-se fase normal com colunas de hidróxido de cálcio. Entretanto, essas colunas não são comerciais e sua preparação apresenta sérios problemas de reprodutibilidade. Fases poliméricas reversas

C_{30} foram desenvolvidas e otimizadas para a separação de carotenoides e seus isômeros.⁸⁰

Devido ao fato dos carotenoides serem moléculas maiores que a cadeia das fases estacionárias das colunas C_{18} , aproximadamente 30 Å contra 21 Å (Figura 31), imaginou-se que interações mais extensivas deveriam ocorrer com fases estacionárias com cadeias mais longas. As fases C_{30} foram preparadas com base neste pressuposto e as separações dos isômeros obtidas foram sensivelmente melhores que nas fases C_{18} .⁸¹

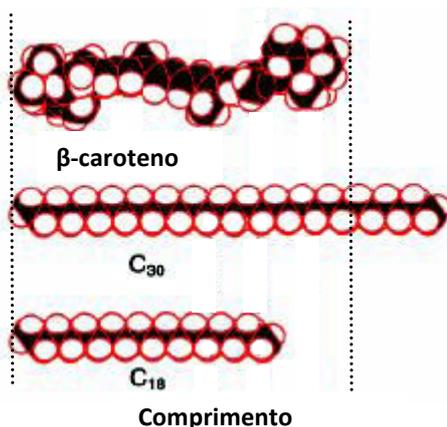


Figura 31. Comparação do comprimento da molécula de β-caroteno com as fases reversas C₁₈ e C₃₀. Reproduzido com permissão. Copyright© 2014 YMC

16.4. Colunas com partículas inferiores a 2µm

Na década de 1990 estavam disponíveis partículas de sílica com 1,5 µm. No entanto, colunas montadas com estas partículas, mesmo que curtas, resultavam em pressões bastante elevadas. Os sistemas cromatográficos até então desenvolvidos apresentavam limites de pressão de trabalho entre 4000 e 6000 psi. O uso dessas partículas para a construção de colunas obrigaria os sistemas cromatográficos a trabalharem nos seus limites, e, dessa maneira, haveria desgaste acelerado de seus componentes, principalmente selos dos pistões e bombas. Por isso, a utilização deste tamanho de partícula foi desencorajada.

Outro grande entrave no uso de coluna com partículas desse tamanho está nos sistemas de detecção, porque os picos produzidos em corridas cromatográficas nessas colunas geralmente são extremamente finos, podendo chegar a apenas 0,1 segundo de largura. Picos tão finos não são detectados corretamente pela maioria dos detectores comumente existentes, com exceção do detector de massas de tempo de voo (TOF).⁸²

Na primeira década dos anos 2000, a companhia Waters lançou no mercado o primeiro sistema cromatográfico comercial

para trabalhar com pressão elevada, o cromatógrafo líquido de ultraeficiência (CLUE), comercialmente batizado de ACQUITY®. O equipamento foi desenvolvido para trabalhar em pressões superiores a 15000 psi, e foram desenvolvidos detectores capazes de monitorar corridas cromatográficas com picos estreitos. As principais vantagens do sistema, em comparação com os sistemas CLAE, são as corridas cromatográficas, em geral, cinco vezes mais rápidas, além de um ganho de 2 a 3 vezes de sensibilidade. O ganho de resolução ainda traz outro grande benefício, a diminuição do efeito matriz das amostras, pois os interferentes são melhores separados dos analitos de interesse. Dessa maneira, as rotinas de extração e limpeza da amostra podem ser simplificadas ou até mesmo pode-se trabalhar com amostras integrais.⁸³

Em aplicações onde a rotina analítica é grande, os ganhos da introdução de sistemas CLUE são inquestionáveis, pois otimiza os dois grandes gargalos analíticos, o tempo de corrida cromatográfica e o preparo da amostra. No entanto, os métodos cromatográficos devem ser modificados e, evidentemente, os sistemas adquiridos.

Diversos fabricantes apresentaram seus sistemas de ultraeficiência e muitos desenvolvedores de fases estacionárias as suas versões de colunas sub 2 µm. Algumas empresas colocaram no mercado uma linha

de colunas com partículas intermediárias entre 2 e 3 µm. Essas colunas poderiam ser utilizadas tanto em sistemas de CLUE como em CLAE, beneficiando os usuários de CLAE, que não pretendiam investir em novos sistemas cromatográficos com o ganho de resolução, sensibilidade e rapidez nas separações cromatográficas.

Referências Bibliográficas

- ¹ Sítio da Biblioteca Digital Perseus. Pliny the Elder, The Natural History 77-79. Disponível em: < <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/> >. Acesso em: 13 Novembro 2012.
- ² Moberg, A. Victor Hartwall Sr. (1800–1857) The scientist who started up an industry, The Finnish Academies of Technology: Helsinki, 2004.
- ³ Matteucci, C. Lectures on the Physical Phenomena of Living Beings. Longman, Brown, Green and Longmans: London, 1847.
- ⁴ Runge, F. F. Der Bildungstrieb der Stoffe veranschaulicht in selbständig gewachsenen Bildern: (Fortsetzung der Musterbilder), 1855. [\[Link\]](#)
- ⁵ Runge, F. F. Hauswirtschaftliche Briefe: Erstes Dutzend, 1866. [\[Link\]](#)
- ⁶ Bussemas, H. H.; Ettre, L. S. Forerunners of Chromatography: Runge's Self-Grown Pictures. *Milestones in Chromatography* **2004**, *22*, 262. [\[Link\]](#)
- ⁷ Runge, F. F. Zur Farben-Chemie: Musterbilder für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Zeichner, Maler, Verzierer und Zeugdrucker. Mittler, 1850. [\[Link\]](#)
- ⁸ Goethe, J. W. V.; Biedermann, W.; Lyon, O. Goethes Gespräche. F. W. V. Biedermann: Leipzig, 1889.
- ⁹ Rubin, M. B. The history of ozone. The Schonbein period, 1839-1868. *Bulletin for the History of Chemistry* **2001**, *26*, 40. [\[Link\]](#)
- ¹⁰ Kahlbaum, G. W. A. The letters of Jöns Jakob Berzelius and Christian Friedrich Schönbein, 1836-1847, Williams and Norgate: London, 1900.
- ¹¹ Ettre, L. S. The predawn of paper chromatography. *Chromatographia* **2001**, *54*, 409. [\[CrossRef\]](#)
- ¹² Goppelsroeder, F. Capillaranalyse, Buchdruckerei Emil Birkhäuser: Basel, 1901. [\[Link\]](#)
- ¹³ Newesely, H. Friedrich Goppelsroeder - A protagonist of modern chromatography? *Chromatographia* **1990**, *30*, 595. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁴ Ettre, L. S. M.S. Tswett and the invention of chromatography. *Lc Gc Europe* **2003**, *16*, 2. [\[Link\]](#)
- ¹⁵ Krasnovsky, A. A. Chlorophyll isolation, structure and function: major landmarks of the early history of research in the Russian Empire and the Soviet Union. *Photosynthesis Research* **2003**, *76*, 389. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁶ Berezkin, V. G. Biography of Tswett, Mikhail, Semenovich, and Translation of Tswett preliminary communication on a new category of adsorption phenomena. *Chemical Reviews* **1989**, *89*, 279. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁷ Tswett, M. S. About a new category of adsorption phenomena and their application for biochemical analysis. *Tr Warshaw Obshch Estestvoisp Otd Biol* **1903**, *14*, 20.
- ¹⁸ Abraham, M. H. 100 years of chromatography - or is it 171? *Journal of Chromatography A* **2004**, *1061*, 113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁹ Meyer, V. R. Tswett, Michael Columns - Facts and speculations. *Chromatographia* **1992**, *34*, 342. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁰ Pacheco, S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009. [\[Link\]](#)
- ²¹ Ettre, L. S.; Sakodynskii, K. I. M. S. Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903-1910). *Chromatographia* **1993**, *35*, 329. [\[CrossRef\]](#)
- ²² Pacheco, S.; Godoy, R. L. O.; Peixoto, F. M.; Gouvêa, A. C. M. S.; Santiago, M. C. P. A.; Felberg, I.; Borguini, R. G. Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale. *Analytical Chemistry: an Indian Journal* **2013**, *12*, 194. [\[Link\]](#)
- ²³ Berezkin, V. G. M.S. Tswett's intellectual heritage and modern chromatography.

- Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *56*, 587. [CrossRef]
- ²⁴ Ettre, L. S. M.S. Tswett and the 1918 Nobel Prize in chemistry. *Chromatographia* **1996**, *42*, 343. [CrossRef]
- ²⁵ Jössang, P. Homage to Tswett. *Nature* **1992**, *356*, 100. [CrossRef]
- ²⁶ Engelhardt, H. One century of liquid chromatography from Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2004**, *800*, 3. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Willstätter, R.; *Untersuchungen Uebwr Chlorophyll*, 1a. ed., Springer: Berlin, 1913.
- ²⁸ Sítio oficial do Prêmio Nobel de Química. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1915/willstatter-lecture.html>. Acesso em: 8 Dezembro 2012.
- ²⁹ Livengood, J. Why was M. S. Tswett's chromatographic adsorption analysis rejected? *Studies in History and Philosophy of Science* **2009**, *40*, 57. [CrossRef]
- ³⁰ Meyer, V. R.; Ettre, L. S. Early evolution of chromatography: the activities of Charles Dhéré. *Journal of Chromatography A* **1992**, *600*, 3. [CrossRef]
- ³¹ Ettre, L. S.; Wixom, R. L. Palmer, Leory Sheldon (1887-1944) and the beginnings of chromatography in the United States of America. *Chromatographia* **1993**, *37*, 659. [CrossRef]
- ³² Palmer, L. S. Carotenoids and Related Pigments: The Chromolipids. Chemical Catalog Company: New York, 1922.
- ³³ Palmer, L. S.; *Tese de Doutorado*, University of Missouri, 1913.
- ³⁴ Schertz, F. M. The Pure Pigments, Carotin and xanthophyll, and the Tswett adsorption method. *Plant Physiology* **1929**, *4*, 337. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁵ Ettre, L. S.; Horvath, C. Foundations of modern liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **1975**, *47*, 422A. [CrossRef]
- ³⁶ Ettre, L. S.; Morris, P. J. T. Katharine Hope Coward: A pioneering user of chromatography. *Chromatographia* **2004**, *60*, 613. [CrossRef]
- ³⁷ Martin, A. J.; Synge, R. L. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal* **1941**, *35*, 1358. [PubMed]
- ³⁸ Sítio oficial do Prêmio Nobel de Química. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/index.html>. Acesso em: 2 Novembro 2012.
- ³⁹ Tiselius, A. A new procedure for adsorption analysis. *Science* **1941**, *94*, 145. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁰ Claesson, S. Frontal analysis and displacement development in chromatography. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1948**, *49*, 183. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴¹ Synge, R. L. M. Chromatographic analysis - Summarizing paper. *Discussions of the Faraday Society* **1949**, *7*, 164. [CrossRef]
- ⁴² Claesson, S. Theory of frontal analysis and displacement development. *Discussions of the Faraday Society* **1949**, *7*, 34. [CrossRef]
- ⁴³ Chemistry, T. R. S. O. Contents pages. *Discussions of the Faraday Society* **1949**, *7*, 1. [CrossRef]
- ⁴⁴ Spackman, D. H.; Stein, W. H.; Moore, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry* **1958**, *30*, 1190. [CrossRef]
- ⁴⁵ Kresge, N.; Simoni, R. D.; Hill, R. L. The fruits of collaboration: Chromatography, amino acid analyzers, and the chemical structure of ribonuclease by William H. Stein and Stanford Moore. *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 6. [Link]
- ⁴⁶ Sítio oficial do Prêmio Nobel de Química. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/>. Acesso em: 2 Novembro 2012.
- ⁴⁷ Stein, W. H.; Moore, S. Chromatography of amino acids on starch columns; separation of phenylalanine, leucine, isoleucine, methionine, tyrosine, and valine. *The Journal of Biological Chemistry* **1948**, *176*, 337. [PubMed]
- ⁴⁸ Moore, S.; Stein, W. H. Photometric ninhydrin method for use in the

- chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry* **1948**, *176*, 367. [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Moore, S.; Stein, W. H. Chromatography of amino acids on starch columns; solvent mixtures for the fractionation of protein hydrolysates. *The Journal of Biological Chemistry* **1949**, *178*, 53. [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Stein, W. H.; Moore, S. Amino acid composition of beta-lactoglobulin and bovine serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry* **1949**, *178*, 79. [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Partridge, S. M.; Westall, R. G. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 1. Separation of organic bases and amino-acids using cation-exchange resins. *Biochemical Journal* **1949**, *44*, 418. [[PubMed](#)]
- ⁵² Partridge, S. M.; Brimley, R. C. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 2. The separation of organic acids and acidic amino-acids by the use of anion-exchange resins. *Biochemical Journal* **1949**, *44*, 513. [[PubMed](#)]
- ⁵³ Partridge, S. M. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 3. Fractionation of a protein hydrolysate. *Biochemical Journal* **1949**, *44*, 521. [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ Partridge, S. M. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 4. the isolation of glucosamine and histidine from a protein hydrolysate. *Biochemical Journal* **1949**, *45*, 459. [[Link](#)]
- ⁵⁵ Partridge, M. W.; Brimley, R. C. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 5. Separation of the basic amino-acids. *Biochemical Journal* **1950**, *46*, 334. [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ Partridge, S. M.; Brimley, R. C. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 6. effect of temperature on the order of displacement. *Biochemical Journal* **1951**, *48*, 313. [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Partridge, S. M.; Brimley, R. C. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 7. Separations using a strongly basic resin. *Biochemical Journal* **1951**, *49*, 153. [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Partridge, S. M.; Brimley, R. C. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 8. A systematic method for the separation of amino-acids. *Biochemical Journal* **1952**, *51*, 628. [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Claesson, S. A new method for the observation of zones of colourless substances on a chromatographic column. *Nature* **1947**, *159*, 708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Bauman, W. C.; Skidmore, J. R.; Osmun, R. H. Dowex 50. *Industrial & Engineering Chemistry* **1948**, *40*, 1350. [[CrossRef](#)]
- ⁶¹ Moore, S.; Stein, W. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *The Journal of Biological Chemistry* **1951**, *192*, 663. [[PubMed](#)]
- ⁶² Hirs, C. H.; Moore, S.; Stein, W. H. Isolation of amino acids by chromatography on ion exchange columns; use of volatile buffers. *The Journal of Biological Chemistry* **1952**, *195*, 669. [[PubMed](#)]
- ⁶³ Hirs, C. H.; Moore, S.; Stein, W. H. A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry* **1953**, *200*, 493. [[PubMed](#)]
- ⁶⁴ Hirs, C. H.; Stein, W. H.; Moore, S. The amino acid composition of ribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry* **1954**, *211*, 941. [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Moore, S.; Stein, W. H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *The Journal of Biological Chemistry* **1954**, *211*, 907. [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Moore, S.; Stein, W. H. Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. *The Journal of Biological Chemistry* **1954**, *211*, 893. [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Soupart, P.; Moore, S.; Bigwood, E. J. Amino acid composition of human milk. *The Journal of Biological Chemistry* **1954**, *206*, 699. [[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Stein, W. H.; Moore, S. The free amino acids of human blood plasma. *The Journal of Biological Chemistry* **1954**, *211*, 915. [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Stein, W. H. A chromatographic investigation of the amino acid constituents

- of normal urine. *The Journal of Biological Chemistry* **1953**, *201*, 45. [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Tallan, H. H.; Stein, W. H.; Moore, S. 3-Methylhistidine, a new amino acid from human urine. *The Journal of Biological Chemistry* **1954**, *206*, 825. [[PubMed](#)]
- ⁷¹ Tallan, H. H.; Bella, S. T.; Stein, W. H.; Moore, S. Tyrosine-O-sulfate as a constituent of normal human urine. *The Journal of Biological Chemistry* **1955**, *217*, 703. [[PubMed](#)]
- ⁷² Bailey, J. L.; Moore, S.; Stein, W. H. Peptides obtained by peptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry* **1956**, *221*, 143. [[PubMed](#)]
- ⁷³ Hirs, C. H. W.; Moore, S.; Stein, W. H. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry* **1956**, *219*, 623. [[PubMed](#)]
- ⁷⁴ Hirs, C. H. W.; Stein, W. H.; Moore, S. Peptides obtained by chymotryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease. A partial structural formula for the oxidized protein. *Journal of Biological Chemistry* **1956**, *221*, 151. [[PubMed](#)]
- ⁷⁵ Moore, S.; Spackman, D. H.; Stein, W. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analytical Chemistry* **1958**, *30*, 1185. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁶ Pacheco, S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014. [[Link](#)]
- ⁷⁷ Maldaner, L.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova* **2010**, *33*, 1559. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁸ Kirkland, J. J.; Destefano, J. J. Controlled surface porosity supports with chemically-bonded organic stationary phases for gas and liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **1970**, *8*, 309. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁹ Faria, A. M.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. State-of-the-Art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, *20*, 1385. [[CrossRef](#)]
- ⁸⁰ Emehiser, C.; Sander, L. C.; Schwartz, S. J. Capability of a polymeric C₃₀ stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, *707*, 205. [[CrossRef](#)]
- ⁸¹ Sander, L. C.; Sharpless, K. E.; Pursch, M. C₃₀ Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, *880*, 189. [[CrossRef](#)]
- ⁸² Wu, N.; Collins, D. C.; Lippert, J. A.; Xiang, Y.; Lee, M. L. Ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for fast separations. *Journal of Microcolumn Separations* **2000**, *12*, 462. [[CrossRef](#)]
- ⁸³ Houghton, R.; Grace, P. UHPLC - Why all the hype ? Chromatography Today, *Waters Corporation*. [[Link](#)]