

En memoria de Tswett. 100 años de Cromatografía

Coral Barbas y F. Javier Rupérez

Sección de Química Analítica, Facultad de CC. Experimentales y de la Salud, Universidad S. Pablo-C.E.U., Madrid

En mayo de este año se ha celebrado en Moscú (no podía ser en otro lugar) el tercer Symposium on Bioseparation Sciences, un Congreso Internacional dedicado a la ciencia de las separaciones, en el que, además de conmemorar el centenario de la cromatografía, se ha destacado el perfil humano e investigador de Tswett, el creador de la cromatografía, y sus aportaciones científicas. Quizá ello pueda servir de excusa para darle un repaso a los orígenes de nuestra ciencia.

Siempre que hacemos una introducción histórica a la cromatografía, iniciamos con una frase parecida a: "el término cromatografía fue empleado por primera vez por Tswett cuando en 1903..." y, con el tiempo, ha acabado pareciendo que todo el mérito de nuestro protagonista era meramente lingüístico, porque las horas lectivas dan para pocos recordatorios históricos.

Queremos aquí dedicar un pequeño homenaje a Tswett, con un resumen de parte de la información recopilada por Eugenia Marchlewski Senchekova [1], profesora asociada del Instituto Vavilov de Historia de la Ciencia y Tecnología de la Academia de Ciencias en Moscú.

VIDA Y TRABAJO DE M.S. TSWETT

Mikhail Tswett nació en 1872 en Asti (Italia), donde sus padres, por motivos de salud, viajaban con frecuencia. Era hijo de Semen Nikolaevich Tswett, oficial ruso recaudador de impuestos y María de Dorozza, italiana que había vivido en Turquía. La madre murió a los pocos días de su nacimiento y él, con poca salud, fue llevado a Suiza con un ama de cría. Mikhail Semenovich pasó su infancia y juventud primero en Lausana y después en Ginebra, y allí estuvo en contacto con una importante colonia rusa, lo que le permitió estar al tanto de los hitos políticos y culturales de la patria de su progenitor.

En 1891 obtuvo su "Certificado de Madurez" y animado por su padre decidió acceder a la Universidad de Ginebra. En 1893 se graduó y considerando que se había formado en el centro más activo de la moderna fisiología vegetal, dedicó su trabajo a la bioquímica y citofisiología de las plantas, y en 1896 presentó su tesis doctoral titulada "Investigación en fisiología celular. Contribuciones al conocimiento de los movimientos de protoplasma, mem-

branas plasmáticas y cloroplastos". Tras un largo viaje para conocer los laboratorios italianos más relevantes de la época en su campo, tomó la decisión de dar un cambio a su vida yendo a Rusia.

Una vez allí comenzó a buscar trabajo y descubrió que su doctorado no era considerado válido y que debía realizar una nueva tesis doctoral, para la que eligió el campo de la clorofila y los cloroplastos. No se puede decir que Tswett fuera bienvenido en Rusia. Pasó por las Universidades de San Petesburgo y Kazan, sin obtener un puesto fijo. En 1901 surgió la posibilidad de acceder a una plaza en esta última Universidad, que él rechazó ya que por entonces había tenido la oferta de trabajar como ayudante en la Universidad de Varsovia, en un laboratorio mejor equipado para su trabajo. En esta Universidad presentó su segunda tesis doctoral. En 1907 se casó con Elena Aleksandrovna Trusevich, que trabajaba como bibliotecaria en dicha Universidad. Empezó entonces una buena etapa de su vida, pues incluso pasó a ser profesor contratado en el Instituto Politécnico de Varsovia.

DE LA CLOROFILA A LA IDEA DE LA CROMATOGRAFÍA

Siguiendo las etapas del método científico, antes de comenzar sus estudios sobre la clorofila, Tswett recopiló y estudió en profundidad la intensa investigación existente sobre el tema realizada por sus predecesores y contemporáneos, lo que se tradujo en una revisión de los principales periodos, métodos de estudio y descripciones de la clorofila.

De aquella revisión ya se entreveía que algunos autores de la época se planteaban las posibles modificaciones de la clorofila cuando era extraída de las plantas con la ayuda de reactivos químicos para purificar el compuesto en estado sólido.

Los esfuerzos de Tswett se encaminaron a eliminar las razones que podrían hacer cambiar la naturaleza del pigmento verde, por lo que utilizó hojas frescas y eliminó la calefacción. Esta búsqueda de un método más racional para la investigación de los pigmentos de las plantas llevó a Tswett a su principal logro científico: el desarrollo de la cromatografía, que abrió una nueva era en el estudio de estos pigmentos, y sobre todo, de la clorofila. Su trabajo entre 1898 y 1900, con 14 publicaciones en revistas britá-

nicas y rusas, se recopiló en un trabajo titulado "Composición físico-química de la partícula de clorofila. Investigación experimental y crítica", que constituyó su Tesis Magistral en 1901.

Durante sus experimentos para intentar extraer la clorofila de las hojas sin modificar, Tswett justificó la falta de resultados cuando se utilizaba éter de petróleo y los resultados positivos cuando se añadía una pequeñísima cantidad de etanol a la presencia de fuerzas de **adsorción** entre los pigmentos y la matriz de los cloroplastos y encaminó sus esfuerzos a nuevos métodos físicos que permitieran el estudio de la clorofila en su estado natural.

Esta idea de competir con las fuerzas de **adsorción** dio lugar a los experimentos sobre la identificación de materiales capaces de adsorber pigmentos existentes en las hojas verdes, desorbiendo de forma diferencial los componentes de la mezcla.

En 1901 llegó a la conclusión que los compuestos cristalinos obtenidos por investigadores del prestigio de Borodin o Monteverde eran sólo artefactos y en realidad consistían en la mezcla de clorofilas a y b derivatizadas con alcohol etílico. Esta afirmación fue considerada insolente y sus datos dudosos.

El 21 de marzo de 1903 fue un día memorable para la historia de la cromatografía. En la Sección de Biología de la Sociedad de Ciencias Naturales de Varsovia, Tswett presentó un trabajo titulado "Sobre la nueva categoría de fenómenos de **adsorción** y sus aplicaciones al análisis bioquímico". En ella, por primera vez, se establece una clara definición del proceso en el que se basa la nueva técnica analítica: "En la actualidad, bajo el término adsorción se combinan varios fenómenos, que, aunque posiblemente diferentes en naturaleza, corresponden a la siguiente definición básica: concentración de gases, vapores, líquidos o compuestos disueltos sobre la superficie de cuerpos sólidos".

En una posterior publicación en alemán en 1906, Tswett describió con detalle cómo obtenía los pigmentos de hojas frescas trituradas con éter de petróleo al que añadía pequeñas cantidades de alcohol, que posteriormente eran eliminadas por agitación con agua destilada. El extracto de pigmentos se separaba en sus componentes con ayuda del "cromatógrafo". En su primera versión fue tan simple como el que se encuentra en la figura 1 (todavía utilizado en cromatografía preparativa) y después evolucionó al sistema de la figura 2 para aumentar el número de experimentos. En sus trabajos hasta 1910 Tswett examinó hasta 128 adsorbentes en los que describió diferentes comportamientos.

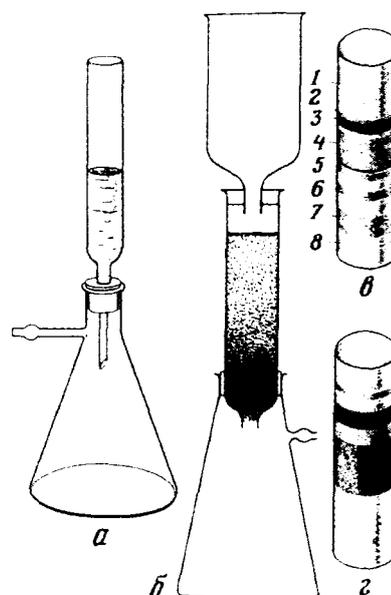
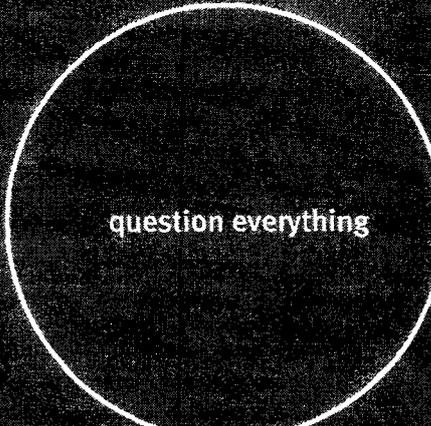


Fig. 1. Las primeras "unidades cromatográficas" de M. Tswett para el análisis de pequeñas y grandes cantidades de sustancias. A la derecha, los "cromatogramas" de pigmentos de hojas de plantas, con 8 zonas diferentes en uno, y la misma muestra tras el tratamiento de los pigmentos con ácido.

Tras anunciar la invención de esta nueva técnica en 1903, Tswett la empleó para obtener muestras químicamente puras de las clorofilas a y b, y aportó la prueba incuestionable de la heterogeneidad del pigmento verde de las plantas, aunque no fue el primero en proponer esta heterogeneidad. Además descubrió una tercera forma de clorofila en algas, la clorofila c.

A Tswett se le ha considerado posteriormente el descubridor de todas las formas de clorofila, aunque él siempre atribuyó al científico inglés Sorby este descubrimiento, realizado treinta años antes. De hecho, por este empeño, Tswett entró en polémica con L. Marchlewski, el principal investigador europeo de la hemoglobina y la clorofila al principio del siglo XX, quien, junto con C. Schunk, se arrogó el descubrimiento de las dos formas principales. Tswett afirmó que los experimentos de Marchlewski y Schunk no eran sino meras reproducciones de los experimentos de Sorby, y en defensa de la novedad de su método y de sus resultados, Marchlewski declaró que Tswett mentía e incluso que los artículos de Tswett no merecían ninguna atención y además que el método cromatográfico sería algo que no tendría ninguna utilidad en el futuro.





question everything

Naciste curioso.

Eras la última persona en preguntar a tus padres antes de ir a dormir. Y la primera en preguntar al profesor.

No te conformas con lo que hay.

Siempre preguntas, ¿qué podría ser?

Empujas la sociedad hacia delante.

En Thermo Electron estamos para ayudarte.

Como líderes en el suministro de la instrumentación más tecnológicamente avanzada para laboratorios y entornos de producción, nuestra misión es darte los medios.

Sea cual sea el reto al que hagas frente, encontrarás que tenemos todo lo necesario para analizar, detectar, medir y controlar.

Porque mucho antes de un gran avance, hay una pregunta

Visítanos en www.thermo.com

● Analiza • Detecta • Mide • Controla

ELECTRON CORPORATION

En los años siguientes se mantuvo una agria polémica entre los dos investigadores, centrada en la existencia de las distintas formas de las clorofilas, que pareció zanjada cuando Marchlewski aceptó que la metodología de Tswett era adecuada y que Sorby había descrito previamente resultados como los suyos.

Las discusiones más intensas de Tswett fueron con el químico orgánico R. Willstätter, que sería premio Nobel en 1915, principal discípulo del fundador de la moderna química orgánica alemana, A. Baeyer, premio Nobel de 1905.

Willstätter siguió una aproximación química para el estudio de la composición y naturaleza de los pigmentos vegetales, analizando y estudiando la estructura de varios derivados de esos pigmentos mediante la acción de determinados reactivos como ácidos, álcalis, etc.

La discusión se mantuvo durante muchos años, dado que Tswett mantenía que no se podía hacer ese análisis orgánico puesto que las sustancias no estaban suficientemente purificadas, porque las técnicas empleadas no permitían la total separación de los compuestos, mientras que Willstätter afirmaba que no se podía considerar purificación un proceso que no se basaba en la cristalización para dar lugar a un compuesto sólido.

A pesar de estas polémicas, Tswett logró en vida un cierto reconocimiento a su trabajo, pues le llegaron a conceder en 1912 el premio Akhmatov (consistente en 1000 rublos), y fue incluso propuesto para la obtención del Premio Nobel de 1918. El mentor destacó en su informe los trabajos realizados sobre la **adsorción**.

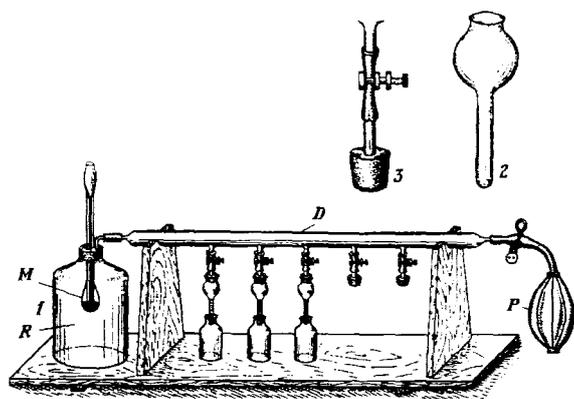


Fig. 2. "Unidad cromatográfica" para múltiples columnas con sistema de presión

A partir de 1910 su salud, que nunca había sido muy buena, empezó a deteriorarse y por si ello fuera poco Rusia, en plena Revolución, decidió tomar parte en la Primera Guerra Mundial. En una época convulsionada por profundos cambios, Tswett perdió todos sus archivos y fases adsorbentes, ya cuidadosamente recopiladas por entonces.

El 16 de junio de 1919 murió, a los 47 años, víctima de su debilitado corazón y de una vida siempre en condiciones de precariedad económica.

La actitud enormemente crítica hacia la investigación de Tswett sobre clorofilas y carotenoides por parte de sus colegas demuestra que sus innovaciones no encontraron gran apoyo. Las actitudes mayoritarias en aquellos años fueron predominantemente negativas y durante la primera década tras la muerte de Tswett el número de publicaciones en los que se usaba la cromatografía disminuyó radicalmente, principalmente porque los resultados obtenidos por el primer cromatografista del mundo fueron ignorados.

Uno de los motivos aducidos para esta falta de reconocimiento fue que la principal publicación de Tswett no fue accesible para los científicos de la Europa Occidental porque estaba escrito en ruso, y además porque era una rareza bibliográfica, una edición de su tesis doctoral. Aunque esto pueda ser cierto, no es menos cierto que Tswett publicó numerosos artículos en revistas de otros países, y realizó demostraciones de su técnica en las distintas sociedades científicas europeas, pues sus conocimientos de francés, ruso, inglés y alemán le permitieron estar en contacto con las sociedades internacionales de mayor prestigio. También se ha aducido para justificar esta falta de reconocimiento el que las publicaciones de Tswett fueran mayoritariamente dedicadas al campo de los pigmentos vegetales en revistas de botánica, pero también presentó sus resultados en revistas de química francesas y alemanas.

El olvido en el que se mantuvo el descubrimiento de Tswett es posible que se deba sobre todo a la falta de confianza que alguno de los principales científicos de su tiempo mantuvieron acerca de la cromatografía, fundamentalmente Willstätter. Mientras vivió, nadie excepto Tswett se atrevió a desafiar a Willstätter cuando afirmaba que él había sido el primero en obtener las clorofilas a y b químicamente puras, y tras la muerte de Tswett en 1919, la investigación sobre los pigmentos de las plantas fue prácticamente monopolizada por la escuela de Willstätter.

Como Ettre y Horváth escribieron mucho más tarde. "...en este periodo Willstätter era el Papa (*sic*) en este campo" (el de las clorofilas), por lo que Syngé llegó a afirmar en 1970 que "...el peso de la autoridad científica de Willstätter hizo que la sociedad científica ignorara las ideas de Tswett".

En los años treinta revivió el interés por la técnica, y fue "redescubierta" por Winterstein y Stein en Alemania para separar los distintos carotenoides de las plantas.

Existe una frase que Tswett escribió varias veces, cuya autoría ha sido atribuida a distintos personajes: "Cualquier avance en la ciencia es un avance del método". Resume muy bien lo que fue su vida y su principal descubrimiento: una técnica poderosísima para conocer más acerca de los pigmentos vegetales.

Varios años tras su muerte, a su lápida se añadió el siguiente epitafio: "**Destinado a descubrir la cromatografía, la ciencia que separa moléculas y una personas**".

Bibliografía

- (1) Senchenkova, E.M. *Michael Tswett. The Creator of Chromatography*. Davankov, V.A. & Ettre, L.S., eds. Russian Academy of Sciences. Moscú, 2003.

* * *

