

# Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)

Rafael Berbert Chust <sup>a</sup>

A Cromatografia de Líquidos (HPLC) é uma técnica analítica de grande impacto actual e com um vasto campo de aplicações, tanto na Indústria como na Universidade e Departamentos Governamentais, seja para o controle de qualidade de rotina ou como potente ferramenta para a investigação pura e aplicada.

No entanto, e apesar de dispor de tão vasto campo de utilização, não encontra no nosso país uma divulgação e uma informação adequada e acessível, à sua altura e que se impõe, especialmente por parte de especialistas nesta área.

O presente trabalho tem por objectivo divulgar a Cromatografia de Líquidos (HPLC), os seus fundamentos e os seus campos de aplicação, estando dividido em quatro partes, como sejam: Introdução, Teoria Fundamental, A Coluna Cromatográfica e O Equipamento.

## INTRODUÇÃO

A Cromatografia de Líquidos ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography), como é mais vulgarmente conhecida, consiste num método analítico que tem por objectivo a separação de distintas espécies químicas presentes numa amostra. A separação processa-se por meio de um mecanismo de interacção selectiva entre as moléculas do soluto (amostra) e duas fases, uma estacionária e outra móvel.

A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro rígido (normalmente de aço ou vidro) no interior do qual se encontra um material de enchimento formado por pequenas partículas.

A fase móvel ou solvente flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injectada pela coluna e pelo detector.

As substâncias presentes na amostra, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, dispõem de distintos graus de «afinidade» com as fases móvel e estacionária e por conseguinte as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Pode-se então concluir que a substância com maior «afinidade» com a coluna é aquela que elui por último e, por oposição, a substância que elui em primeiro lugar será a de menor «afinidade» com o enchimento (fase estacionária).

Como conclusão, a Cromatografia de Líquidos separa as espécies químicas consoante as suas funções moleculares e por conseguinte é um método que pode ser utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes tipos de produtos.

## TEORIA FUNDAMENTAL

### Equação Fundamental

Ao procedermos a uma separação cromatográfica por meio de um Cromatógrafo de Líquidos, obtemos um cromatograma, ou seja, uma representação gráfica da separação referida por meio de picos correspondentes a cada um dos componentes da amostra. Para que se possa avaliar qualitativamente a separação, é necessário definir termos como resolução, capacidade de retenção e selectividade relativos à separação ou ao sistema cromatográfico.

### Resolução (R)

Suponhamos o cromatograma representado na Figura 1. Define-se resolução como o grau ou magnitude da separação. A expressão matemática de resolução (R) é dada como sendo a diferença entre os volumes de eluição de dois componentes da amostra ( $V_1$  e  $V_2$ ) pela média da largura de banda cromatográfica de ambos ( $W_1$  e  $V_2$ ), ou seja:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{1/2 (W_1 + W_2)} \quad (1)$$

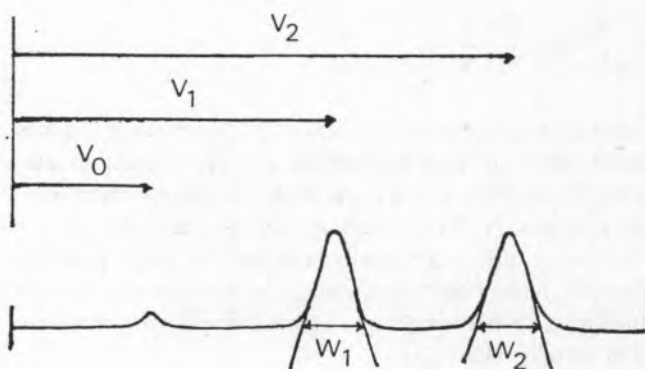


FIGURA 1  
Cromatograma-tipo

Note-se que  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $W_1$  e  $W_2$  podem ser expressos em unidades de volume, tempo ou mesmo comprimento no cromatograma, devendo no entanto ter-se em atenção que às medições devem corresponder unidades coerentes, pois que R é uma grandeza adimensional, ou seja, sem unidades.

<sup>a</sup> Director Técnico-Comercial KONIK INSTRUMENTS, S.A.

Sendo assim, a resolução deverá ser entendida como o grau segundo o qual um pico se distingue de outro no cromatograma.

#### Capacidade de Retenção ( $k'$ )

É sabido que a Cromatografia de Líquidos é uma técnica utilizada frequentemente em análise qualitativa, por meio da verificação da retenção de um dado componente da amostra em determinado sistema cromatográfico. O termo universal utilizado para identificar ou localizar um pico é o factor de capacidade ( $k'$ ) de um sistema cromatográfico. O factor de capacidade relativo a um dado componente é calculado matematicamente segundo a seguinte equação:

$$k' = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \quad (2)$$

onde  $V_1$  e  $V_0$  serão medidos nas mesmas unidades.  $V_0$  é o chamado «volume morto» e é uma medida da retenção para um componente que não interacciona com o sistema. Em termos práticos,  $V_0$  é o volume do sistema desde o injector até ao detector, podendo, devido ao volume insignificante da tubagem, ser assumido como o volume da coluna que não está ocupado pelo enchimento.

Podemos concluir então que  $k'$  mede a capacidade de um sistema cromatográfico para reter os componentes da amostra. Note-se que os valores de  $k'$  para cada componente são independentes de factores como o fluxo de solvente e a dimensão da coluna.

#### Selectividade ( $\alpha$ )

Outro factor a considerar é a selectividade do sistema cromatográfico, a qual tem a ver directamente com a química envolvida na separação. O factor selectividade ( $\alpha$ ) ou factor de separação é expresso matematicamente por:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \quad (3)$$

Como se pode concluir, o factor de selectividade diz-nos quando um pico elui relativamente a outro, estando directamente relacionado com a capacidade do sistema em promover a separação. Assim, se  $\alpha=1$ , temos que  $k'_2=k'_1$ , e por conseguinte, não ocorre qualquer separação. Logo, para que o sistema tenha poder para separar os componentes de uma amostra,  $\alpha$  deve ser maior que 1 (considerando-se óptimo um valor de  $\alpha$  igual a 1,2).

#### Número de Pratos Teóricos ( $N$ )

Outra propriedade importante a levar em conta numa separação cromatográfica é o número de pratos teóricos ( $N$ ) de um sistema, o qual descreve a dispersão do pico cromatográfico em relação ao seu centro, constituindo ao mesmo tempo um método fácil para o controle diário da eficiência do sistema. Se assumirmos que o pico cromatográfico é uma curva de Gauss perfeita, o número de pratos teóricos do sistema pode ser definido, em termos estatísticos clássicos, como:

$$N = \frac{V}{S} \quad (4)$$

onde  $V$  é medido em unidades de tempo, volume ou comprimento e  $S$  é a variação da dispersão dos picos, medida nas mesmas unidades. Em geral,  $S$  é resolvido directamente em função da medida de uma só largura de pico ( $W$ ).

O método mais simples para o cálculo de  $N$  resulta no traçado de uma tangente à curva gaussiana nos seus pontos de inflexão e extrapolando a linha de base até a intersecção com a tangente (Figura 2).

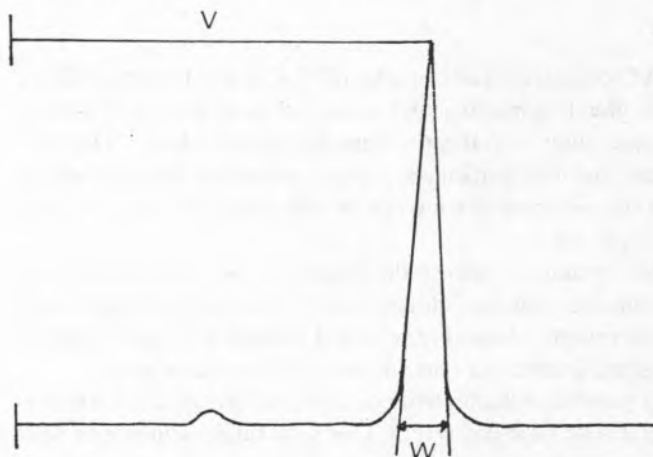


FIGURA 2  
Método Sigma 4 para cálculo de  $N$

Quando a largura de pico é assim determinada,  $S=W/4$  e portanto

$$N = \frac{16 V^2}{W^2} \quad (5)$$

Este método, denominado Sigma 4, é o mais conhecido e utilizado devido à sua simplicidade.

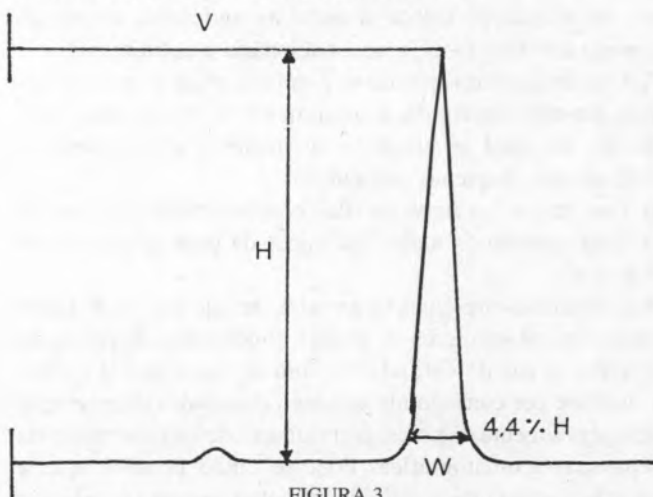


FIGURA 3  
Método Sigma 5 para cálculo de  $N$

Outro método, considerado mais exacto, é o denominado Sigma 5, onde se mede a largura do pico a 4,4% da altura do mesmo, de forma perpendicular (Figura 3). Sendo assim,  $S=W/5$  e portanto

$$N = \frac{25 V^2}{W^2} \quad (6)$$

Duas conclusões se podem extrair do cálculo de N:

– se o pico é simétrico, ambos os métodos devem originar o mesmo resultado;

– se os picos apenas se aproximam da forma gaussiana, originarão um número de pratos teóricos baixo.

Dever-se-á chamar-se a atenção para o facto de que o número de pratos teóricos é um termo relativo, ou seja, não é necessariamente o mesmo para todos os sistemas, onde solvente, coluna, fluxo, equipamento e outras variáveis são distintas. No entanto, o cálculo de N é um excepcional método para o controle do desgaste da coluna cromatográfica em um dado sistema.

#### Altura Equivalente a um Prato Teórico (H)

Tomando novamente a definição de N, uma conclusão que se pode intuir é de que o número de pratos teóricos de um dado sistema é uma variável dependente do comprimento da coluna cromatográfica, devendo assim dispor de uma relação de proporcionalidade com este último. Assim, a expressão que define esta relação é:

$$H = \frac{L}{N} \quad (7)$$

onde N já foi definido anteriormente e L é o comprimento da coluna cromatográfica, sendo portanto H definido como sendo a altura equivalente a um prato teórico.

A altura equivalente a um prato teórico (H) descreve portanto a eficiência do material de enchimento da coluna e é independente do comprimento da mesma. Note-se que H, de todos os termos já definidos, é o único que apresenta unidades dimensionais (mm, em geral).

Por agora, a importância de H resume-se a relacionar N com o comprimento da coluna L, sendo que o número de pratos teóricos aumenta quando aumenta o comprimento da coluna, sendo a inversa também verdadeira. Mais adiante, H deterá um importante papel no estudo dos fenómenos relacionados com a dinâmica da separação cromatográfica.

#### Equação Fundamental da Cromatografia

Por último, resta relacionar todos os factores anteriormente definidos, tendo em vista integrá-los numa única equação fundamental. Assim temos:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{1/2 (W_1 + W_2)} \quad k' = \frac{V_2 - V_0}{V_0}$$

$$\alpha = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \quad N = \frac{16 V^2}{W^2}$$

Se assumirmos que  $W = W_1 = W_2$ , por substituição obteremos:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{W}$$

e logo temos que a Equação Fundamental da Cromatografia assume a seguinte forma:

$$R = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} N \frac{k'}{(k' + 1)} \quad (8)$$

Para que se tenha uma ideia da validade desta equação, suponhamos que  $k'=0$ , ou seja, que não ocorre retenção ( $V=V_0$ ):

$$R = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} N \frac{0}{(0 + 1)} = 0$$

logo temos que a resolução é nula, o que é correcto.

Suponhamos agora que  $\alpha=1$ , ou seja, que não ocorre separação dos componentes da amostra ( $k'_2=k'_1$ ):

$$R = \frac{1}{4} \frac{(1 - 1)}{1} N \frac{k'}{(k' + 1)} = 0$$

sendo por conseguinte a resolução nula, o que também é correcto.

A conclusão final que podemos extrair é de que a resolução de uma dada separação cromatográfica depende directamente da capacidade de retenção dos componentes da amostra, da selectividade para a referida separação e da eficiência da coluna cromatográfica.

#### A Equação de Van Deemter

Até agora tem-se procedido a um estudo, por assim dizer, «estático» da separação cromatográfica, partindo de conceitos geométricos de representação da mesma. No entanto, como se sabe, a separação depende de vários factores de ordem dinâmica, como sejam o fluxo do solvente e a velocidade com que se processam as interacções químicas substância-fase móvel-fase estacionária.

Uma forma de avaliar a eficiência do sistema cromatográfico e, em particular, da coluna cromatográfica, obtem-se através do traçado de uma curva que relacione a altura equivalente a um prato teórico (H) e a velocidade linear da frente do solvente (u). O traçado desta curva  $H=f(u)$  tem a denominação de Curva de Van Deemter e tem por objectivo avaliar o tipo de enchimento utilizado e dar indicações para a optimização da separação cromatográfica.

Anteriormente visualizamos a largura da banda cromatográfica (pico) como uma grandeza gráfica à qual podemos aplicar conceitos trigonométricos. Passaremos a estudá-la agora como uma relação directa com o que se passa no interior da coluna de separação.

Assim sendo, podemos admitir que o alargamento da banda cromatográfica depende fundamentalmente de quatro contribuições e será o resultado da soma destas:

a) comprimento da migração

Este fenómeno deve-se a que distintas moléculas duma mesma substância podem ter distintas trajectórias no leito cromatográfico (Figura 4). A contribuição deste efeito é dado pela expressão:

$$A=y dp \quad (9)$$

onde dp é o valor médio do diâmetro de partícula de um dado enchimento e y é uma constante relativa ao mesmo.



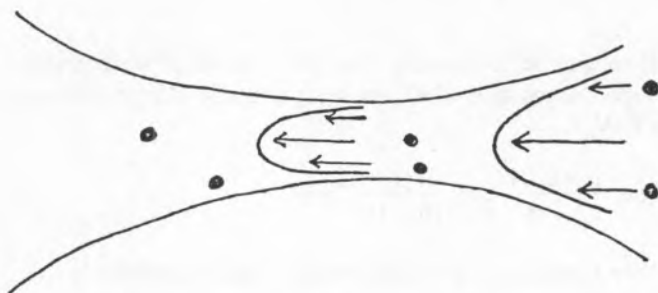


FIGURA 4

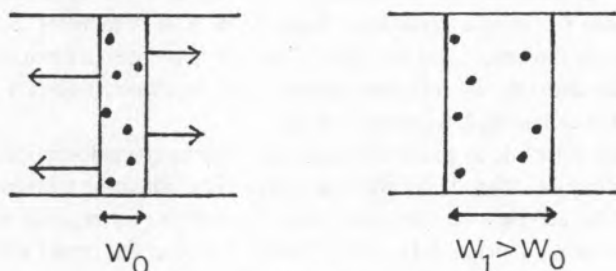
*Trajectórias de migração de moléculas de uma mesma substância*

#### b) difusão longitudinal

Se uma banda cromatográfica permanece por um largo período dentro de uma coluna de separação tenderá a difundir-se em todas as direcções, incluindo o sentido longitudinal da mesma, produzindo por conseguinte um alargamento (diluição) da banda (Figura 5). Este efeito é uma função do período de permanência da banda na coluna e está relacionado com a velocidade linear da frente de solvente. A expressão que o define será:

$$B = \frac{2 \lambda D_m}{u} \quad (10)$$

onde  $\lambda$  é uma constante do enchimento,  $D_m$  a difusão da substância na fase móvel e  $u$  a velocidade linear da frente de solvente.

FIGURA 5  
*Difusão longitudinal*

#### c) transferência de massa na fase móvel

Para que possam ocorrer os fenómenos de partilha/adsorção de uma molécula na fase estacionária, é necessário que a mesma se encontre próxima da superfície do enchimento. Se tal não ocorre, seguirá percorrendo a coluna sem interaccionar. Em dado instante, um certo número de moléculas de uma dada substância encontram-se em posição de interaccionar com o enchimento, enquanto outras estão suficientemente afastadas do mesmo, o que implica que após um curto espaço de tempo, estas últimas migrarão através da coluna enquanto as primeiras serão realmente retidas pelo enchimento. O resultado obtido é um significativo alargamento de banda. A expressão que define esta contribuição é dada por:

$$C_m = \frac{k^2}{x a (a + k_2)} \frac{dp^2 u}{D_m} \quad (11)$$

onde  $k$  é o coeficiente de distribuição entre as fases,  $a$  é o raio da fase móvel e  $x$  uma constante da mesma. Note-se que o coeficiente de distribuição de uma dada substância num dado sistema é definido como:

$$k = \frac{[S]_s}{[S]_m} \quad (12)$$

sendo  $[S]_s$  a concentração da substância na ou sobre a fase estacionária e  $[S]_m$  a sua concentração na fase móvel. O factor de capacidade  $k'$  é então definido como:

$$k' = \frac{S_s}{S_m} \quad (13)$$

onde  $S_s$  é a quantidade de substância na fase estacionária e  $S_m$  a quantidade da mesma na fase móvel. Refira-se que estes termos são referidos ao raio da fase móvel ( $a$ ), sendo portanto:

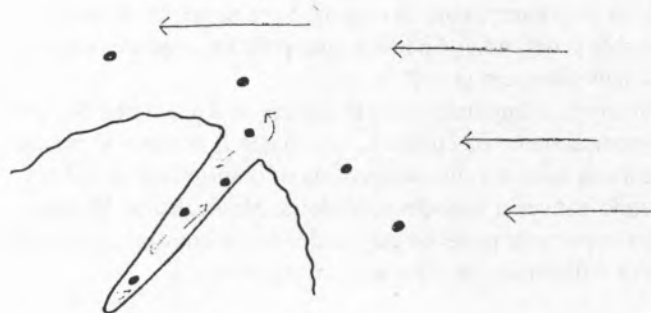
$$k' = \frac{k}{a} \quad (14)$$

#### d) transferência de massa na fase estacionária

Dispondo a fase estacionária de um volume finito porém significativo, será de esperar que as moléculas difundam da superfície do enchimento até a fase estacionária (poros) e tornem a sair à superfície novamente (Figura 6). O alargamento da banda poderá ser então descrito pela expressão:

$$C_s = \frac{2}{3} \frac{a k}{(a + k)^2} \frac{df^2}{D_s} u \quad (15)$$

onde  $df$  é a profundidade da fase estacionária (poro) e  $D_s$  a difusibilidade da substância na fase estacionária.

FIGURA 6  
*Transferência de massa na fase estacionária*

Podemos concluir então que o efeito do comprimento da migração é independente da velocidade linear (Eq. 9), que a contribuição da difusão longitudinal é inversamente proporcional à velocidade linear (Eq. 10) e que a transferência de massa, tanto na fase móvel (Eq. 11) como na fase estacionária (Eq. 15), é directamente proporcional à velocidade linear da frente de solvente.

Assim sendo, e considerando  $C = C_m + C_s$ , temos que a forma simplificada para exprimir a equação de Van Deemter é:

$$H = A + \frac{B}{u} + C u \quad (16)$$

onde  $A$ ,  $B$ , e  $C$  são, como vimos anteriormente, constantes de um dado sistema cromatográfico e permitem explicar a forma típica da curva de Van Deemter.

A expressão acima reproduzida (Eq. 16) é aplicável directa-

mente em Cromatografia de Gases (GC). No entanto, em HPLC temos a considerar dois outros factores:

– a difusão longitudinal é quase desprezível, pois as moléculas não se difundem tão rapidamente em um líquido como num gás, o que implica também uma maior resistência à transferência de massas.

– a difusão de Eddy, fenómeno directamente relacionado com as zonas da coluna onde o solvente não flui por estar «preso» nos poros do enchimento. Assim sendo, uma molécula que se encontre diluída neste solvente só tem saída por meio de difusão, sendo esta difusão particular designada por Difusão de Eddy.

O modelo matemático para descrever a difusão de Eddy é por demais complexo e não está ao alcance deste trabalho. No entanto, a sua participação é de tal modo importante que a forma simplificada da equação de Van Deemter para HPLC, por analogia à expressão aplicável à GC (Eq. 16), é a seguinte:

$$H = A + \frac{B}{u} + C u^x \quad (17)$$

onde C e x são constantes, com x permitindo valores menores que 1.

A curva de Van Deemter para HPLC aparecerá então com uma pendente linear a fluxos baixos, desviando-se da linearidade a fluxos altos, em oposição à constante linearidade da curva de Van Deemter para o GC (Figura 7).

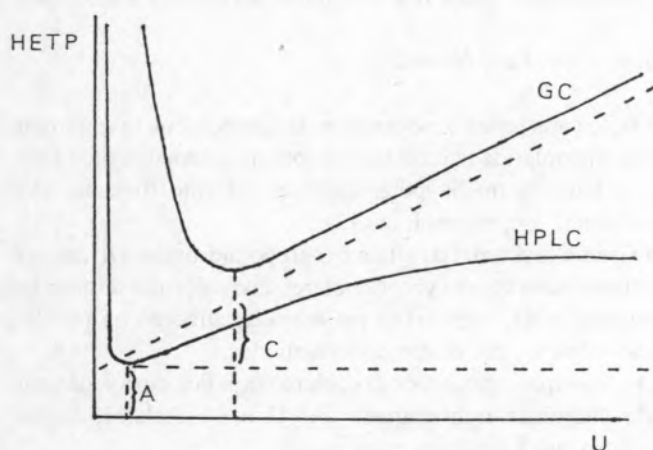


FIGURA 7  
Curvas de Van Deemter para GC e HPLC

De referir que as curvas de Van Deemter são curvas obtidas de forma prática e que o estudo matemático que vimos visa essencialmente construir um modelo que permita explicar os fenómenos que ocorrem durante a separação cromatográfica. Outro ponto a realçar é que a curva de Van Deemter é uma característica de cada sistema cromatográfico, variando com alterações de enchimento, dimensão da coluna, viscosidade da fase móvel e temperatura, entre outros factores.

Por último, apresentam-se curvas típicas de Van Deemter obtidas com a mesma coluna porém com distintos sistemas de solventes ( $H_2O$ =água, IPA=isopropanol, MeOH=metanol e  $CH_3CN$ =acetonitrilo) (Figura 8).

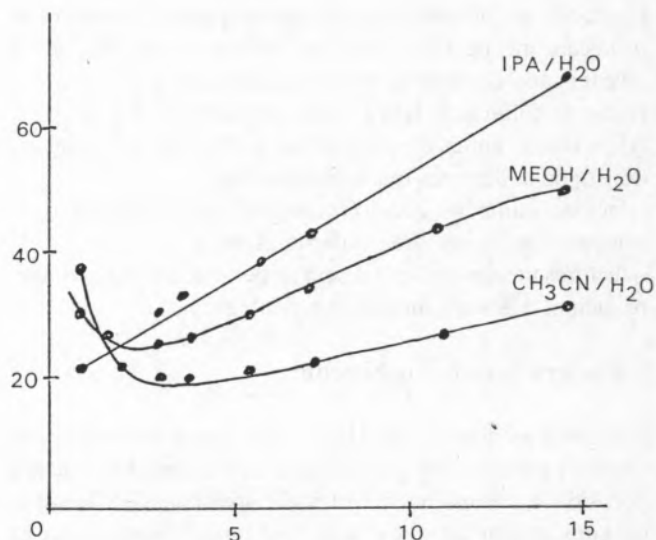


FIGURA 8  
Curvas de Van Deemter utilizando uma coluna  $C_{18}$  e três sistemas de solventes distintos

## A COLUNA CROMATOGRÁFICA

A coluna cromatográfica é onde se dá o processo de separação das substâncias que compõem a amostra, sendo sem dúvida o constituinte mais importante e mais crítico de um sistema cromatográfico.

A escolha de uma coluna depende de variados factores, os quais vamos procurar enumerar no decorrer deste trabalho, por forma a elucidar alguns pontos que normalmente são pouco claros à vista de um cromatografista pouco experiente. Em primeiro lugar, é conveniente definir as características da amostra, de acordo com o esquema apresentado na Figura 9.

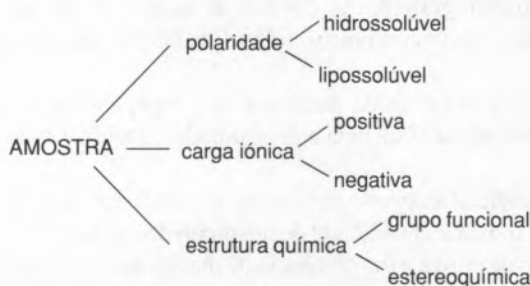


FIGURA 9  
Classificação das características de uma amostra

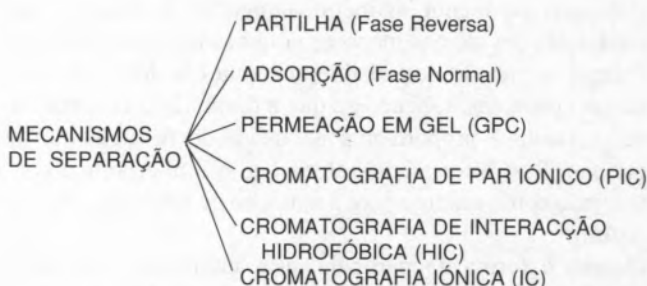


FIGURA 10  
Alguns Mecanismos de Separação em HPLC

Conforme as características da amostra, poder-se-á escolher o mecanismo de separação que melhor se lhe adapte. Os mecanismos de separação mais difundidos pelos quais se regem as colunas de HPLC estão presentes na Figura 10.

Além disso, numa coluna cromatográfica há a considerar dois tipos de factores que a caracterizam:

- factores químicos, que dizem respeito ao enchimento (propriedades químicas, área superficial, etc.);
- factores mecânicos, que dizem respeito ao invólucro (comprimimento, diâmetro interno, material, etc.).

### Características do Enchimento

Em geral as colunas de HPLC têm como base dos seus variados enchimentos partículas de sílica, devido à sua alta porosidade e consequente elevada área superficial, sejam eles unicamente de sílica ou de fase ligada (bonded phase), em que através de uma reacção química se promove a ligação de um grupo funcional aos grupos hidroxilo livres da sílica. Desta forma, os factores que afectam em maior grau as performances de uma coluna e que fazem diferir os variados enchimentos dos variados fabricantes são:

a) sílica-base:

- tamanho e forma de partícula;
- área superficial;
- distribuição dos tamanhos de poro.

b) tipo de fase ligada:

- grupo funcional ( $C_{18}$ ,  $C_8$ , CN, etc.);
- fase monofuncional ou polifuncional.

c) teor em carbono (carbon load).

d) segunda passagem de fase ligante (end capping).

e) procedimentos de fabrico.

Como se pode depreender, a sílica-base do enchimento desempenha um papel fundamental no desenrolar de um processo cromatográfico. As diferenças entre as variadas sílicas disponíveis encontram-se subordinadas aos seguintes factores:

- o tamanho e a forma da partícula, que representam um papel importante na eficiência e estabilidade do leito cromatográfico;
- a área superficial, expressa em metros quadrados por grama ( $m^2/g$ ), que indica a capacidade de adsorção do enchimento;
- o tamanho de poro e a transferência de massa, que tem a ver com a velocidade a que se processa a separação bem como o volume molecular óptimo a ser analisado pelo enchimento;
- a química intrínseca da sílica-base, como sejam o pH, o conteúdo em metais e as condições de manufatura.

Em relação ao tamanho da partícula, pode-se afirmar que as partículas de menor diâmetro aumentam a eficiência da separação, devido aos menores volumes mortos. No entanto, a pressão de trabalho aumenta consideravelmente nestas condições, sabendo-se que a diminuição do tamanho de partícula é proporcional ao quadrado do aumento de pressão. Será interessante referir que o limite prático considerado como mínimo para o tamanho de uma partícula são 3  $\mu m$ .

Quanto à forma da partícula, esta implicará uma maior estabilidade do leito cromatográfico no caso de ser esférica, pois que um leito de partículas esféricas é obviamente mais homogêneo e reprodutível que um leito de partículas de

formas irregulares. Em contrapartida, a partícula irregular possui, regra geral e para o mesmo diâmetro, maior área superficial e maior resistência mecânica à erosão provocada pelo fluxo contínuo de eluente. Devido a estes factos, em escala analítica preferem-se enchimentos de partículas esféricas, sendo utilizados os enchimentos de partículas irregulares quase exclusivamente em escala preparativa. Outro factor que pode assumir importância é o custo do enchimento, com vantagem para os enchimentos irregulares.

Já a importância da área superficial e do tamanho de poro tem a ver com o poder de retenção das moléculas à superfície da partícula, em consequência da maior área de adsorção ( $\Leftrightarrow$  maior área superficial) e maior permeabilidade ( $\Leftrightarrow$  maior tamanho de poro). A existência de altos valores para ambos implica uma menor transferência de massa por unidade de tempo, logo, maior retenção.

Quanto às características químicas da sílica, é de salientar que esta dissolve-se de forma acentuada em meios de pH superior a 7,5. Assim sendo, tanto em fase normal como em fase reversa, seja em fases estacionárias apenas de sílica como com base de sílica, o pH de trabalho deve situar-se entre 2 e 8. De notar que os enchimentos de base polimérica são bastantes mais tolerantes em relação a variações de pH, cobrindo normalmente uma gama de pH de 1 a 13.

### Mecanismos de Separação

Após haver-se focado os factores relativos ao enchimento, discutir-se-á de seguida os vários mecanismos de separação presentes na Figura 10 e os fenómenos que os caracterizam.

#### Adsorção (Fase Normal)

O que caracteriza o mecanismo de adsorção, ou fase normal, é a alta polaridade da fase estacionária (normalmente sílica) e a baixa a média polaridade do solvente (hexano, clorofórmio, isopropanol, etc.).

O grupo funcional da sílica é o grupo hidroxilo -OH, o qual interacciona com os grupos polares das moléculas da amostra (grupos -OH, -NH<sub>2</sub>, etc.) por meio de atracção ou partilha electrónica entre os átomos envolvidos.

As principais aplicações das colunas de sílica são a separação de vitaminas lipossolúveis (A, D e E), ftalatos, fenóis, aflatoxinas e anilinas, entre outras.

#### Partilha (Fase Reversa)

O mecanismo de partilha, ou fase reversa, é o mais amplamente difundido e por esta razão merece um destaque especial neste trabalho.

Este mecanismo baseia-se na partilha de electrões entre as nuvens electrónicas das cadeias moleculares da fase estacionária ligada e da substância a separar, sendo estas interacções originadas por ligações por pontes de hidrogénio instantâneas, forças de London e forças de Van der Waals.

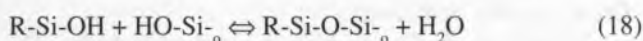
Em relação à fase normal, a fase reversa mostra-se bastante mais versátil, encontrando-se por conseguinte muito mais frequentes referências de aplicação dos seus mecanismos (cerca de 90% dos casos) no universo bibliográfico da HPLC. Além da versatilidade, há a realçar os seus mais



baixos custos operativos relativamente à fase normal, devido ao eluente ser constituído na sua maior parte por água, sendo também utilizados o metanol, o acetonitrilo e o tetrahidrofurano, entre outros, ou seja, solventes de alta ou média polaridade.

Quanto aos grupos funcionais de fase reversa ligada, estes em geral apresentam uma polaridade baixa a média. O mais popular é o C<sub>18</sub>, ou ODS, cujo grupo principal é o grupo octadecilsilano.

Outros grupos funcionais, menos populares mas não menos importantes e úteis são os grupos Fenil, C<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>, CN, NH<sub>2</sub> e Diol, este último utilizado frequentemente em GPC e HIC. O processo de ligação do grupo funcional desejado à sílica-base dá-se por meio de uma reacção química, em meio ácido, entre um grupo organosilano e um dado grupo hidroxilo livre à superfície da sílica, conforme se esquematiza de seguida:



sendo R um radical orgânico.

Já anteriormente se referiu que o pH óptimo de utilização de uma coluna de HPLC é de 2 a 8. Acima de pH 8, a sílica solubiliza-se. Abaixo de pH 2, a fase ligada hidroliza-se, dando origem à reacção inversa do processo de ligação de fase. Conclui-se assim que o uso prolongado de eluente a baixo pH provoca uma considerável redução na vida útil de uma coluna de fase reversa.

Duas características que dizem respeito às fases ligadas e aquilo que as pode distinguir entre si são:

- o teor em carbono (para fases C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, Fenil e CN);
- a segunda passagem de fase ligante (end capping).

O teor em carbono é uma das características que marca a distinção entre duas colunas C<sub>18</sub>, por ex., de distintas origens, pois que diferentes teores de carbono implicam diferentes capacidades de retenção, sendo por conseguinte um índice de maior ou menor hidrofobicidade do enchimento. Por sua vez, o «end capping» é bastante importante na performance de enchimentos de fase reversa. Este processo consiste na ligação de um grupo alquilsilano de pequeno volume aos grupos hidroxilo da sílica-base que ainda permanecem livres após a reacção de derivatização primária. Isto minimiza o efeito dos grupos hidroxilo livres e consequentemente qualquer mecanismo paralelo de adsorção.

Como consequência da reacção de «end capping», temos a considerar:

- «esconde» (derivatiza) os grupos hidroxilo ainda livres após a reacção primária;
- minimiza os mecanismos de retenção paralelos;
- «adiciona» carbono ao enchimento (aumenta o teor em carbono).

De notar que a existência de grupos hidroxilo livres caracteriza-se pela sobre-retenção de substâncias orgânicas com grupos electropositivos, como por ex. as aminas. Este efeito deve-se à interacção entre os átomos electronegativos do oxigénio presentes à superfície do enchimento com os átomos electropositivos do azoto presente nas aminas.

Por último, resta referir as aplicações mais usuais das colunas de fase reversa, conforme o grupo funcional que as caracteriza:

C<sub>18</sub> - PAH's, vitaminas, aminoácidos, drogas terapêuticas, etc.

C<sub>8</sub> - fenóis, alcalóides, proteínas, etc.

C<sub>4</sub> - proteínas.

CN - vitaminas lipossolúveis, pesticidas, corticosteróides, etc.

Fenil - ácidos gordos livres, compostos aromáticos, etc.

No entanto, outras fases ligadas existem livres de carbono e com mecanismos que não se enquadram totalmente nos de adsorção e partilha. De seguida apresentam-se alguns destes grupos funcionais e as suas principais aplicações:

NH<sub>2</sub> - carboidratos, nucleótidos, aminas, etc.

Diol - polióis, proteínas (HIC), etc.

SAX - aniões orgânicos.

SCX - catiões orgânicos.

O mecanismo segundo o qual actua a coluna NH<sub>2</sub> (aminopropilsilano) é maioritariamente um mecanismo de fase reversa, tomando partido da electropositividade dos átomos de azoto presentes na fase estacionária, podendo no entanto ser utilizado como um mecanismo de fase normal. Os solventes mais utilizados são a água e o acetonitrilo, em variadas proporções.

O mecanismo das colunas Diol actua como um mecanismo de partilha, promovendo a interacção entre os átomos de oxigénio presentes no enchimento e na amostra. Os eluentes são em geral soluções salinas.

Os grupos funcionais das colunas SAX e SCX são, respectivamente, uma amina quaternária (tetrabutilamina) e um ácido carboxílico (ácido fenilssulfónico). Estes enchimentos funcionam como resinas de troca iónica e os solventes utilizados são soluções tamponadas.

#### *Permeação em Gel (GPC)*

O mecanismo de GPC, ou exclusão molecular, baseia-se no princípio da exclusão por parte dos poros do enchimento das moléculas de maior volume molecular e da permeação (transferência de massa) nos mesmos por parte das moléculas de menor volume. Assim sendo, numa coluna GPC, as moléculas de maiores dimensões têm menores tempo de retenção (sofrem exclusão) e as de menor dimensão tardam mais tempo a eluir (ou sejam, permeiam). Em geral, a capacidade de separação de cada coluna é determinada pelos tamanhos de poro das partículas que compõem o seu enchimento, medidos usualmente em Angstroms (Å), havendo inclusivamente curvas de calibração de volumes de retenção x log [peso molecular]. Note-se que, à partida, não ocorrem quaisquer fenómenos de interacção e por conseguinte de retenção química em colunas de GPC.

Os principais campos de aplicação da GPC são a análise de polímeros e resinas (solvente orgânico = GPC orgânica) e proteínas (solvente aquoso = GPC aquosa).

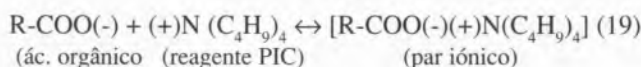
#### *Cromatografia de Par Iónico (PIC)*

A Cromatografia de Par Iónico não é mais que uma modificação engenhosa da Cromatografia de Fase Reversa, resumindo-se a utilizar-se no eluente uma solução de molaridade próxima a 0,005 M de fosfato de tetrabutilamónio (separação de ácidos orgânicos) ou de ácidos alquilssulfónicos de ca-

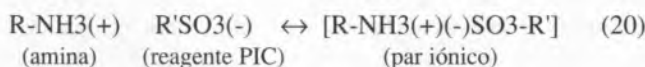
deias lineares de 5, 6, 7 ou 8 átomos de carbono (separação de bases orgânicas).

Como é fácil de concluir, ácidos e bases não interactivam facilmente com a superfície hidrofóbica das colunas de fase reversa (especialmente  $C_{18}$ ), devido à carga associadas a estas espécies; com a adição à fase móvel dos sais referidos, de carga contrária à das moléculas da amostra, permite-se que as mesmas e o sal reagente formem um par electrónico neutro, podendo então interactivar com a fase estacionária por um mecanismo de partilha. O modelo químico das reacções de par iónico são:

– ácidos (meio básico):



– bases (meio ácido):



O comprimento da cadeia dos ácidos alquilssulfónicos é um factor a considerar: quanto maior a cadeia, maior a retenção, ou seja, se utilizarmos como reagente PIC o ácido octasulfónico ( $C_8H_{17}SOOH$ ), este originará uma maior retenção dos compostos básicos da amostra do que a que se originaria ao utilizar o ácido pentanossulfónico ( $C_5H_9SOOH$ ), sendo desta forma um factor de controle da separação. Outros factores que podem ainda influenciar a separação serão a concentração do sal reagente, o pH da fase móvel e o tipo e a concentração do tampão a utilizar.

#### *Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC)*

A Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC) é um mecanismo utilizado quase exclusivamente na separação de proteínas, pois à partida não altera a sua actividade biológica. Os enchimentos para HIC são enchimentos hidrofóbicos, porém em menor grau que os de fase reversa convencional, permitindo a separação das proteínas de forma menos agressiva mediante gradientes de concentração salina, evitando-se assim o recurso a solventes orgânicos.

Os enchimentos são obtidos usualmente por meio de uma primeira derivatização da sílica com uma poliamida, seguida de uma segunda derivatização com um radical propil, hidroxipropil, metil ou pentil, conferindo a derivatização com a poliamida uma maior estabilidade dos enchimentos de HIC em termos de pH do que os enchimentos convencionais.

#### *Cromatografia Iónica (IC)*

O campo de aplicação da Cromatografia Iónica (IC), como o nome indica, dirige-se à separação de aniões e catiões inorgânicos, incluindo os metais de transição.

Os enchimentos para IC são resinas de poliestireno que dispõem de grupos funcionais com capacidade para intercâmbio iónico (por ex.  $Ca^{2+}$  ou  $SO_3^{2-}$ ). Existem ainda colunas com base de sílica, menos vulgares e de menor vida útil, porém apresentando um custo consideravelmente mais baixo. Os eluentes em IC são tampões de pH fortemente ácido

(separação de catiões) ou básico (separação de aniões), suportando as resinas eluentes de pH 1 a 13, em geral.

#### *Outros Mecanismos*

Como as restantes técnicas analíticas, a HPLC não escapa ao engenho dos investigadores e outros mecanismos de separação encontram-se já em fase de crescente utilização. Apresentam-se alguns exemplos:

– Cromatografia de Mecanismo Misto:

Combina um ou mais mecanismos, sendo os mais usuais:

– fase reversa + troca iónica

– exclusão molecular + troca iónica

– Cromatografia por Afinidade:

Utiliza ligandos específicos para a separação de famílias específicas de enzimas, anticorpos ou complexos anticorpo-antigénio, glicoproteínas, etc.

– Cromatografia de Pirkle:

Utiliza fases estacionárias quirais (aceitadores e dadores de electrões  $\pi$ ) para a separação de enantiómeros (isómeros ópticos).

#### **O Invólucro**

Por último, algumas considerações sobre o invólucro, ou seja, a parte exterior da coluna cromatográfica.

Quanto ao material que o constitui, surgem três tipos fundamentais:

– aço (convencional);

– polietileno (cartuchos);

– vidro (metal-free chromatography).

A escolha destes invólucros tanto tem a ver com razões de ordem química como de ordem económica. Os cartuchos possuem inferior durabilidade porém são mais inertes e de mais baixo custo que as colunas convencionais de aço. Já as colunas de vidro, devido ao seu carácter marcadamente inerte, dirigem o seu campo de aplicação à separação de moléculas biologicamente activas, pois não as desnatura; no entanto, devido à sua fragilidade, não se lhes pode aplicar pressões elevadas, limitando a sua aplicação.

Quanto às dimensões das colunas, estas respeitam uma classificação não muito rígida, mas conveniente para se compreender a nomenclatura vulgarmente utilizada em HPLC, conforme o tipo de utilização:

Classificação	Diâmetro Interno	Comprimento
MICROBORE	1 a 2 mm	10 a 30 cm
ANALÍTICA	3,9 a 4,6 mm	15 a 30 cm
SEMI-PREPARATIVA	6,5 a 10 mm	10 a 30 cm
PREPARATIVA	19 a 22,5 mm	25 a 30 cm

Esta classificação tem a ver com a capacidade média de carga das colunas e por conseguinte define o seu campo de utilização preponderante.

Como curiosidade refira-se que actualmente encontram-se disponíveis no mercado uma nova família de colunas, designadas por «Fast-LC». Estas colunas, com apenas 3 a 5 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, são destinadas



a rápidas separações (0,1 a 2 min em média), sendo de bastante utilidade para trabalhos de rotina em amostras pouco complexas.

## O EQUIPAMENTO

Ao equipamento que permite a obtenção de uma separação cromatográfica dá-se vulgarmente o nome de Cromatógrafo. Um cromatógrafo de líquidos é constituído esquematicamente por quatro componentes (Figura 11):

- Sistema de Bombagem ou Bomba;
- Sistema de Injecção ou Injector;
- Sistema de Detecção ou Detector;
- Sistema de Tratamento de Dados.

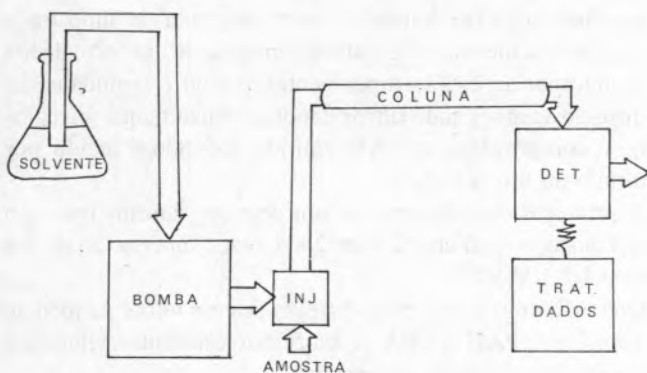


FIGURA 11

*Sistema típico de Cromatografia de Líquidos (HPLC)*

De seguida debruçar-nos-emos muito resumidamente sobre cada um destes componentes.

### Sistema de Bombagem

O sistema de bombagem é o «coração» do cromatógrafo de líquidos, dele dependendo uma variedade de factores. As características que definem um bom sistema de bombagem são as seguintes:

- o fluxo deve ser estável e isento de pulsações, por forma a minimizar o «ruído de fundo» no detector;
  - a gama de fluxos deve ser ajustável aos vários modos de operação de HPLC (microbore, analítica, semi-preparativa), mas sem ser muito ampla para permitir uma boa reprodutibilidade a fluxos baixos. A gama ideal situar-se-á entre 0,1 e 5,0 ml/min;
  - o volume deslocado (= volume da cabeça da bomba) deve ser constante, por forma a facilitar análises quantitativas e qualitativas;
  - a bomba deve suportar altas pressões, pela própria natureza do fim a que se destina. A pressão máxima ideal deverá rondar as 420 atm (aproximadamente 6000 psi);
  - a bomba deve ser facilmente adaptável ao trabalho em gradientes, seja ele a alta como a baixa pressão.
- Existem vários tipos de sistemas de bombagem, sendo o mais usual o de pistão recíproco (Figura 12). Para se conseguir um fluxo livre de pulsações, utilizam-se dois ou três pistões recíprocos em série, sendo a bomba de dois pistões a mais vulgarizada e de melhores resultados práticos.

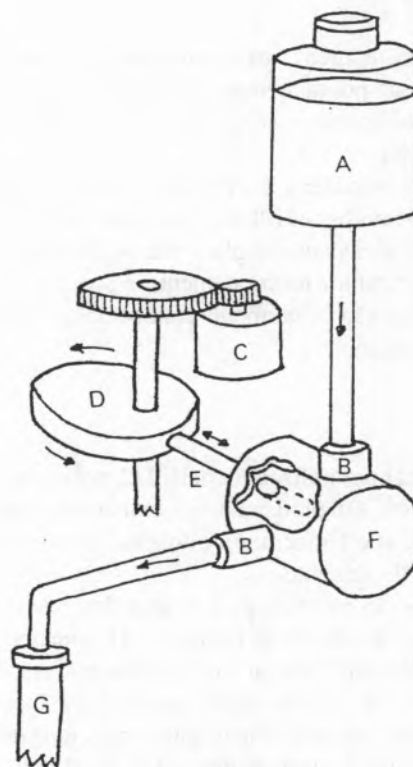


FIGURA 12

*Modelo esquemático de bomba de pistão recíproco: A – reservatório de solvente; B – "check valve"; C – motor eléctrico; D – excêntrico; E – pistão; F – câmara hidráulica (cabeça da bomba); G – coluna*

### Sistema de Injecção

Os sistemas de injecção podem ser de três tipos:

- injecção directa por seringa;
- válvula de injecção;
- válvula de injecção automática (injector automático).

O sistema mais utilizado é o por válvula de injecção, pois origina uma maior reprodutibilidade no volume injectado e por conseguinte melhores resultados em análise quantitativa. Além do mais, podem facilmente ser automatizados e apresentam custos reduzidos. O esquema de funcionamento de uma válvula de injecção está patente na Figura 13.

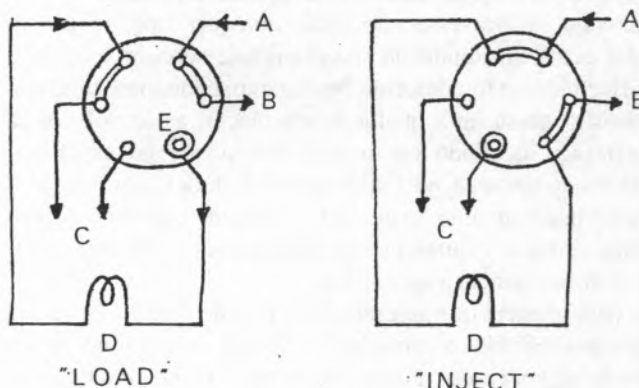


FIGURA 13

*Modelo esquemático de válvula de injecção: A – entrada de solvente (bomba); B – saída (coluna); C – esgoto; D – "loop" de injecção; E – injecção de amostra (needle port)*

## Sistema de Detecção

Actualmente existe uma vasta gama de detectores para HPLC. Uma opção por qualquer um deles dependerá essencialmente das características químicas ou estruturais das espécies a detectar.

Não se pretende proceder a um estudo exaustivo das características dos detectores de HPLC, já que estes se baseiam em instrumentos e propriedades amplamente conhecidos. Vamos assim cingir muito resumidamente à sua enumeração pelo nome por que são vulgarmente conhecidos, geometria e campos de aplicação.

### UV-VIS

São os detectores mais utilizados em HPLC, pois apresentam o mais baixo custo, são praticamente insensíveis a pequenas variações de fluxo e temperatura e totalmente compatíveis para gradientes de solventes.

Estes detectores são constituídos por uma lâmpada de excitação (de Hg para detectores de filtros e de D<sub>2</sub> para detectores espectrométricos), um filtro ou rede de difracção (monocromador) e um divisor do feixe de luz, que dirige cada um dos feixes resultantes e em igual intensidade a cada uma das duas células de detecção (amostra/referência), incidindo depois ambos num fotodetector. Este fotodetector mede então a diferença entre a intensidade de luz que passa pelas duas células, ou seja, que não é absorvida, gerando um sinal eléctrico que é amplificado e seguidamente convertido em unidades de absorção por meio de um comparador logarítmico. A única desvantagem de um detector UV-VIS é a sua selectividade, não podendo ser utilizado na detecção de lípidos, hidrocarbonetos lineares, carboidratos, ácidos gordos e a maior parte dos polímeros.

### Índice de Refracção Diferencial

Os detectores de índice de refracção diferencial são detectores universais e por conseguinte apresentam resposta para qualquer espécie de amostra.

A sua geometria limita-se a uma lâmpada de emissão, que incide o seu feixe luminoso sobre uma célula dupla (amostra/referência), um espelho e um fotodetector. Quando ambas as células estão equilibradas (cheias apenas com fase móvel), a luz que as atravessa não sofre qualquer tipo de desvio (deflexão), incidindo na sua totalidade sobre o espelho e reflectindo no fotodetector. No entanto, quando na célula da amostra passa uma qualquer substância, a luz sofre uma deflexão, incidindo em menor intensidade no espelho e consequentemente no fotodetector. A deflexão/refracção é tanto maior quanto maior for a diferença de composição entre ambas as células, ou seja, quanto maior for a concentração da substância a quantificar.

A desvantagem que apresenta este tipo de detectores é a sua alta sensibilidade a variações de fluxo e temperatura, sendo também, por razões óbvias, incompatível com gradientes de solventes. Devido à já referida sensibilidade às mudanças de temperatura, é usual a utilização de um pequeno forno para a célula de detecção, o que aumenta o seu custo e torna-o ligeiramente mais caro que um detector UV-VIS.

Os seus principais campos de aplicação são a análise de carboidratos, polissacáridos, lípidos, ácidos gordos livres e polímeros em geral (GPC).

### Fluorescência

No universo dos detectores de HPLC, os detectores fluorimétricos são os de maior sensibilidade (na ordem dos ppb), possuindo todas as vantagens dos detectores UV-VIS e ainda a especificidade de permitir discriminar os constituintes de interesse numa matriz complexa de substâncias não fluorescentes.

A geometria de um detector de fluorescência consiste numa lâmpada de excitação (de espectro de bandas ou contínuo) seguida de um filtro de excitação ou uma rede de difracção incidindo o feixe luminoso sobre a célula de amostra e excitando a mesma, originando a emissão de um feixe de luz ao retornar ao estado fundamental, o qual é seguidamente dirigido a um segundo filtro ou monocromador, que selecciona o comprimento de onda emitido, fazendo-o incidir por último no fotodetector.

A principal desvantagem de um detector fluorimétrico é o seu custo, o qual chega a ser 2 a 4 vezes superior ao de um detector UV-VIS.

Quanto a aplicações, estas dirigem-se com maior incidência à análise de PAH's, OPA-aminoácidos, esteróides, vitaminas e aditivos e corantes alimentares.

### Conductividade

O detector de conductividade electrolítica encontra o seu campo de aplicação na Cromatografia Iónica, sendo um detector de alta sensibilidade e selectividade.

O seu princípio de funcionamento consiste na medida da conductividade total da solução (eluente + amostra) por meio de uma célula tubular com dois, quatro ou mesmo seis eléctrodos de Ag, Pt ou aço inoxidável, que por sua vez são parte integrante de uma ponte de Wheatstone, gerando desta forma um sinal que será posteriormente tratado e quantificado. A corrente alterna imposta possui uma frequência entre 1 a 10 kHz.

Os detectores conductivimétricos em geral possuem grande sensibilidade de detecção (até 10<sup>-8</sup> M), sendo no entanto extremamente sensíveis a mudanças de temperatura. Devido a este factor e também à alta conductividade do eluente, é necessário recorrer frequentemente a processos de compensação e supressão electrónica ou química.

Os principais campos de aplicação são os da Cromatografia Iónica, ou seja, a análise de aniões, catiões e metais de transição.

### Electroquímico

O detector electroquímico ou amperométrico tem conhecido uma larga expansão devido à sua grande sensibilidade na detecção de aminas biogénicas.

O seu princípio de detecção consiste na oxidação ou redução da substância a analisar na superfície do eléctrodo de trabalho; o ganho ou perda de electrões resultante da redução ou

oxidação da substância produz uma corrente proporcional à concentração da mesma ao passar na célula de detecção.

A célula de detecção, que se encontra numa caixa de Faraday para evitar interferências eléctricas, é composta por três eléctrodos:

- referência (Ag/AgCl);
- auxiliar (Pt);
- trabalho (Ag, Au ou Pt para substâncias inorgânicas e carbono vítreo para substâncias orgânicas).

Os detectores electroquímicos possuem uma grande sensibilidade de detecção (até  $10^{-7}$  M) e permitem uma grande especificidade na identificação das espécies, obtida através da possibilidade de selecção do potencial redox da reacção.

Os campos de aplicação deste tipo de detector são a análise de amins biogénicas (catecolaminas) e alguns iões de difícil detecção por conductimetria, como sejam os cianetos, sulfuretos, sulfitos, halogenetos e arsenatos, entre outros.

#### *Outros Detectores*

Além dos detectores referidos, que são os de mais ampla utilização, outros há que por sua especificidade são também utilizados em HPLC. Alguns destes detectores são enumerados de seguida:

- detector de rede de díodos (PAD);
  - detector de infravermelhos (IR);
  - detector fototérmico;
  - detector de rotação óptica (detector polarimétrico);
  - detector de massas (MS);
  - detector de fotoionização (PID);
  - detector de ionização de chama (FID);
- entre outros.

#### **Sistema de Tratamento de Dados**

Em geral, os detectores de HPLC emitem um sinal de saída potenciométrico (mV). Para que se possa quantificar esse sinal é necessário a obtenção de um registo gráfico ou de um aparelho que possua capacidade para tratar o sinal por si mesmo, de forma automatizada.

Actualmente existem três distintos níveis de sistemas de tratamento de dados, como a seguir se refere.

#### *Registadores Potenciométricos*

Este tipo de aparelhos limita-se a receber o sinal de saída do detector e proceder ao traçado da variação do mesmo ao longo do tempo.

A quantificação dos picos resultantes é efectuada manualmente por planimetria, triangulação ou corte e pesagem.

#### *Integradores Electrónicos Digitais*

Designados simplesmente por integradores, este tipo de aparelhos recebe o sinal do detector e procede ao cálculo da área dos picos por meio de um software especializado, permitindo distintos métodos de quantificação, como sejam o de normalização de áreas, padrão interno, padrão externo, etc.

Devido ao seu custo moderado, os integradores têm substituído largamente os registadores potenciométricos.

#### *Computadores Pessoais (PC)*

Actualmente, devido ao baixo custo e popularidade dos PC, foram desenvolvidos conjuntos software + interfaces que permitem a utilização dos mesmos no tratamento de dados em cromatografia.

Estes sistemas permitem as potencialidades dos vulgares integradores e mais uma elevada capacidade de armazenamento de cromatogramas para um posterior tratamento por menorizado e comparação de resultados.

Permitem ainda a integração numa rede integrada de aquisição de dados LIMS (Laboratory Information Management System), para gestão integrada e total automatização no laboratório.

#### **CONCLUSÕES**

A Cromatografia de Líquidos (HPLC) é uma técnica de elevado potencial analítico, cobrindo um vasto campo de aplicações. No entanto a sua parca divulgação em Portugal e a inexistência de um meio eficaz de troca de informações sobre os seus avanços e potencialidades tem obstado a que tome um lugar de destaque, que lhe é certamente devido, no universo nacional da Química Analítica.

Aproveito esta oportunidade para lançar o repto à constituição de uma Associação Portuguesa de Cromatografia, que se dedicasse a promover e apoiar os vários ramos da Cromatografia e técnicas afins.

Se assim for, o objectivo deste trabalho foi atingido.

#### **Referências**

- L. R. Snyder, J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1979
- D. Chan Leach, M. A. Stadalius, J. S. Berus, L. R. Snyder, *Reversed Phase HPLC of Basic Samples*, LC\*GC 6, 494 (1988)
- H. M. McNair, *Equipment for HPLC - VI*, J. Chromatography Sci. 22, 521 (1984)
- G. Horvai, F. Pál, Zs. Niegysz, K. Tóth, E. Pungor, *Electrochemical Detectors in Ion Chromatography*, LC\*GC 6, 1058 (1988)
- E. S. Yeung, *Detectors for Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1986
- L. I. Esteban, *Introducción a La Cromatografía de Gases*, Universidad Complutense de Madrid, 1979



# Convite à Reflexão...

## Entre a História e a Filosofia da Ciência

A esmagadora maioria do trabalho histórico preocupa-se com processos, com o desenvolvimento ao longo do tempo. Em princípio, o desenvolvimento e a mudança não precisam de desempenhar um papel semelhante em filosofia, mas na prática, quero agora insistir, se o fizessem, a visão do filósofo mesmo da ciência estática, e assim de questões como a estrutura da teoria e a confirmação da teoria, seria com fruto alterada.

Considerem, por exemplo, a relação entre as leis empíricas e as teorias, que explicarei de modo bastante geral em vista desta breve conclusão. Apesar das dificuldades reais, que eu algures talvez tenha realçado as leis empíricas acomodam-se relativamente bem à tradição da filosofia da ciência. Podem, naturalmente, ser directamente confrontadas com a observação ou a experimentação. Mais de acordo com o ponto que apresento, quando aparecem pela primeira vez, preenchem uma lacuna aparente, fornecendo informação que antes faltava. Na medida em que a ciência se desenvolve, elas podem refinar-se, mas as versões originais permanecem como aproximações às sucessoras, e a sua força é, por conseguinte, ou óbvia ou prontamente captada. Em suma, as leis, na medida em que são puramente empíricas, integram a ciência como adições líquidas ao conhecimento e, assim, nunca estão totalmente deslocadas. Podem deixar de ter interesse e, por conseguinte, não mais ser citadas, mas isso é outra questão. Dificuldades importantes, repito, apresentam-se à elaboração desta posição, dado que já não é claro saber o que deve ser uma lei puramente empírica. Não obstante, como idealização admitida, esta explicação padronizada das leis empíricas ajusta-se bastante bem à experiência do historiador.

No tocante às teorias, a situação é diferente. A tradição considera-as como colecções ou conjuntos de leis. Embora admita que os membros individuais de um conjunto possam ser confrontados com a experimentação apenas através das consequências dedutivas do conjunto no seu todo, ela assimila assim as teorias às leis tão estreitamente quanto possível. Tal assimilação não se ajusta de modo algum à experiência do historiador. Quando este olha para um dado período do passado, pode encontrar lacunas no conhecimento que serão mais tarde preenchidas por leis empíricas. Os antigos sabiam que o ar podia ser comprimido, mas ignoravam a regularidade que relaciona quantitativamente o seu volume e pressão; se lhes perguntassem, admitiriam presumivelmente a lacuna. Mas o historiador raramente ou nunca encontra lacunas semelhantes que venham a ser preenchidas mais tarde pela teoria. Na sua época, a física aristotélica abrangia o mundo acessível e imaginável tão completamente como mais tarde faria a física newtoniana. Para introduzir esta última, a primeira teve de ser literalmente deslocada. Depois de isto ter acontecido, os esforços

para recuperar a teoria aristotélica chocaram com dificuldades de natureza muito diferente das requeridas para recuperar uma lei empírica. As teorias, tal como o historiador as conhece, não podem decompor-se em elementos constituintes em vista de uma comparação directa tanto com a natureza como entre si. Não quer isto dizer que não possam ser analiticamente decompostas, mas antes que as partes legalóides produzidas pela análise não podem, ao contrário das leis empíricas, funcionar individualmente em tais comparações.

Um princípio central da física de Aristóteles era, por exemplo, a impossibilidade do vácuo. Suponham que um físico moderno lhe dissesse que uma aproximação estreita e arbitrária do vácuo se podia agora produzir no laboratório. Provavelmente, Aristóteles ter-lhe-ia respondido que um recipiente esvaziado de ar e outros gases não era o vácuo no sentido em que ele falava. Esta resposta sugeriria que a impossibilidade do vácuo não era, na sua física, uma questão meramente empírica. Suponham agora que Aristóteles admitia o ponto de vista do físico e anunciava que, afinal, podia existir o vácuo na natureza. Então ele teria exigido uma física completamente nova, porque o seu conceito de cosmos finito, dos lugares no seu interior e do movimento natural, se mantêm ou caem com o seu conceito de vácuo. Também neste sentido, o enunciado legalóide «não existe vácuo na natureza» não funcionava como uma lei no interior da física aristotélica. Isto é, não poderia eliminar-se e substituir-se por uma versão melhorada, deixando de pé o resto da estrutura.

Por conseguinte, para o historiador ou, pelo menos, para este aqui presente, as teorias são holísticas em alguns aspectos essenciais. Na medida em que o pode afirmar, elas sempre existiram (embora nem sempre sob formas que se possam descrever confortavelmente como científicas) e, portanto, sempre cobrem o âmbito total dos fenómenos naturais concebíveis (embora a maioria das vezes sem grande precisão). Nestes aspectos elas são claramente diferentes das leis e existem diferenças correspondentes inevitáveis no modo como se desenvolvem e avaliam. Destes últimos processos sabemos muito pouco e não aprenderemos mais enquanto não aprendermos a reconstruir adequadamente teorias seleccionadas do passado. Como acontece hoje, as pessoas preparadas para fazer este trabalho são os historiadores, não os filósofos. Sem dúvida, estes poderiam aprender, mas durante o processo, como sugeri, provavelmente tornar-se-iam também historiadores. Naturalmente, dar-lhes-ia as boas-vindas, mas ficaria pesaroso se, durante a transição, perdessem a sua visão dos problemas, um risco que considero bem real. Para evitar isso, insisto em que a história e a filosofia da ciência continuem a ser disciplinas separadas. O que é preciso, é menos provavelmente produzido por casamento do que pela conversação activa.

Thomas Kuhn, «A Tensão Essencial»