

CALIBRAÇÃO DE MICROPIPETAS POR ESPECTROFOTOMETRIA

1 – Material:

- 1.1 – Balão volumétrico de 250 ml
- 1.2 – Balão volumétrico de 100 ml
- 1.3 - Micropipeta de 10 µl.

2 – Reagentes:

- 2.1 – Hidróxido de Sódio 0,01 M
- 2.2 – p-nitrofenol (NIST SRM 938) a 105 mg/dl.

3 – Preparação dos reagentes:

- 3.1 – NaOH 0,01 M

- 3.2 – p-nitrofenol a 105 mg/dl:

Dissolver com água reagente 105 mg de p-nitrofenol, em balão volumétrico de 100 ml e completar até a marca.

- 3.3 – Diluições de referência:

Preparar três diluições diferentes em 3 balões volumétricos de 250 ml, colocando nos balões NaOH 0,01 M, sem completar até a marca;

Pipetar 1,0 ml de solução de p-nitrofenol 105 mg/dl, em cada balão e completar até a marca com NaOH 0,01 M.

3.4 – Diluições de trabalho:

- a. Identificar 5 tubos de 1 a 5 e adicionar em cada 2,5 ml de NaOH 0,001 M, usando uma pipeta calibrada para cada tubo;
- b. Com a micropipeta a ser calibrada adicionar em cada tubo 10 µl de p-nitrofenol a 105 mg/dl;
- c. Se a micropipeta é TD, rinsar a mesma quando pipetar o p-nitrofenol para o NaOH;
- d. Homogeneizar bem e realizar a leitura no espectrofotômetro.

4 – Procedimento

4.1 – Leitura da absorbância:

- a. Selecionar o comprimento de onda de 410nm;
- b. Selecionar uma cubeta de 10 mm de diâmetro;
- c. Usar o NaOH 0,01M como branco;
- d. Ler a absorbância de cada uma das diluições de referência, na cubeta selecionada;
- e. Ler a absorbância dos tubos numerados de 1 a 5, das três diluições, preparadas em 3.3;
- f. Calcular a absorbância média das três leituras de referência (A1);
- g. Calcular a absorbância média das leituras das três diluições, preparadas em 3.3 (A2);

Nota: A “absorvidade certificada” de 131,48 log-lcm do p-nitrofenol NIST SRM em NaOH 0,01 M, em 410 nm, deve ser de 0,550.

4.2 – Cálculos:

1 – Equação:

$$A1 \cdot D \cdot V = V1$$

A2

A1 = Absorbância média das 3 diluições de referência (3.3);

A2 = Absorbância média dos 5 tubos (3.4);

D = Diluição utilizada no preparo da solução de trabalho, ou seja 1/251;

V = Volume final do teste em μl (2,5 ml de NaOH = 2500 μl + 10 μl de p-nitrofenol = 2510 μl ;

V1 = Volume que foi pipetado (10 μl)

4.3 – Exemplo:

Se A = 0,550 e se A1 é 0,561, então V1 será:

$$V1 = \frac{A2}{A1} \cdot D \cdot V$$

$$V1 = \frac{0,561}{0,550} \cdot 1/251 \cdot 2510$$

$$V1 = 10,20 \mu\text{l}$$

4.4 – Erro da medida (EM):

1 – Calcular o erro da medida como o valor percentual da medida encontrada em relação ao valor nominal.



Programa Nacional de Controle de Qualidade

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

Provedor de ensaios de Proficiência
para Laboratórios Clínicos,
Bancos de Sangue, Organizações
de Diagnóstico *in vitro* e Alimentos

$$EM = \frac{V1 - VN}{VN} \cdot 100$$

- V1 = Valor que foi pipetado;
VN = Valor nominal da pipeta;
100 = Para converter em porcentagem.

2- Exemplo:

Sendo V1= 10,20 µl como no caso do exemplo anterior e sendo VN=10 µl, o EM será:

$$EM = \frac{(10,20 - 10)}{10} \cdot 100$$

$$EM = 0,2 / 10 \cdot 100 = 2\%$$

5 – Comentários:

1. Toda a vidraria utilizada deve ser Classe A;
2. O NaOH 0,01 M deve ser titulado;
3. A calibração do espectrofotômetro em 410 nm deve ser conferida;
4. O EM deve ser comparado com a especificação do fabricante da micropipeta;
5. Para micropipeta de 10 µl, o EM deve ser inferior a 1%;
6. Diluidores automáticos podem ser calibrados com o uso do mesmo procedimento.

6 – Bibliografia:

- 1 – Clinical Chemistry 2ª edição, pg 18