

## CALIBRAÇÃO DE MICROPIPETAS POR ESPECTROFOTOMETRIA

### Exemplo para uma pipeta de 10 µl

#### 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  $\log^{-1}\text{cm}$  do p-nitrofenol NIST SRM em NaOH 0,01 M, em 410 nm, deve ser de 0,550.

##### 4.2 – Cálculos:

1 – Equação:

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

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  $\mu\text{l}$  (2,5 ml de NaOH = 2500  $\mu\text{l}$  + 10  $\mu\text{l}$  de p-nitrofenol = 2510  $\mu\text{l}$ ;  
V1 = Volume que foi pipetado ( 10  $\mu\text{l}$ )

#### 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.

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

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

2– Exemplo:

Sendo V1= 10,20  $\mu\text{l}$  como no caso do exemplo anterior e sendo VN=10  $\mu\text{l}$ , 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  $\mu\text{l}$ , 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