

CAUSAS DE ERRO DE MEDIÇÃO VOLUMÉTRICA NOS LABORATÓRIOS

Os erros na medição de volumes que ocorrem nos laboratórios têm, não raramente, impactes muito significativos na exactidão dos resultados de ensaios quantitativos. Na origem dos erros de medição de volumes podem considerar-se dois grandes grupos de causas: por um lado, má prática dos operadores; por outro, falhas dos instrumentos de medição.

Os erros devidos a má prática dos operadores só podem ser reduzidos com formação específica adequada. Os erros devidos aos instrumentos podem ser reduzidos com uma manutenção adequada ou compensados tendo em conta os resultados das calibrações periódicas, conforme se demonstra neste artigo.

Isabel Faria, Directora do Normalab – Laboratório de Calibração de Vidraria Volumétrica da Normax

A escolha da vidraria volumétrica é determinante para a garantia da exactidão da medição de volumes. Se os instrumentos não cumprirem uma série de regras e normas de construção (p.e. ISO 384 – Princípios de construção e concepção de vidraria volumétrica) que porventura escapam aos utilizadores, mas que os bons fabricantes cumprem escrupulosamente, não é possível obter resultados com uma boa exactidão e repetibilidade. Hoje em dia, os laboratórios portugueses já se preocupam em adquirir produtos fabricados por empresas com sistemas de gestão da qualidade certificados e, não raramente, exigem que os seus produtos sejam acompanhados de um certificado de série (onde figuram a média e o desvio-padrão para a capacidade relativa a cada série de fabrico) ou mesmo de um certificado de calibração. Contudo, verifica-se frequentemente que, apesar do cuidado na selecção da vidraria na fase de aquisição, os laboratórios, mesmo com sistemas de gestão da qualidade implementados, não dão a devida importância à correcta manipulação e manutenção da vidraria volumétrica.

Manipular bem a vidraria volumétrica

Aquele que é considerado o maior erro na utilização de vidraria volumétrica é o erro de paralaxe, que depende do diâmetro do menisco e da posição do operador relativamente à escala do instrumento graduado. A norma ISO 4787 refere alguns erros experimentais na determinação do volume em função do erro de determinação da posição real do menisco (paralaxe), conforme se mostra na tabela 1. Um pequeno desvio de 1 mm no ajuste do menisco pode significar um erro muito apreciável no volume medido, como se pode concluir observando a tabela 2.

Outro grande inimigo da exactidão quando se utiliza vidraria volumétrica é a contaminação, em particular por gorduras. Na verdade, estas substâncias alteram a forma do menisco dando erros de leitura importantes. Por outro lado, nos instrumentos graduados a escoar, como é o caso das buretas, os líquidos a medir deixam de aderir às paredes numa camada uniforme e, ao invés disso, aglutinam-se formando bolhas. Os desvios causados pela contaminação das buretas (p.e. com o próprio lubrificante das torneiras esmeriladas quando usado em excesso) são muitas vezes da ordem dos 50% da tolerância especificada para o instrumento.

Igualmente frequente, um outro erro de manipulação consiste em utilizar pipetas ou buretas com tempo de espera (p.e. da classe AS segundo DIN) e sem que tenha sido observado o tempo de espera de 15 segundos para as pipetas e de 30 segundos para as buretas.

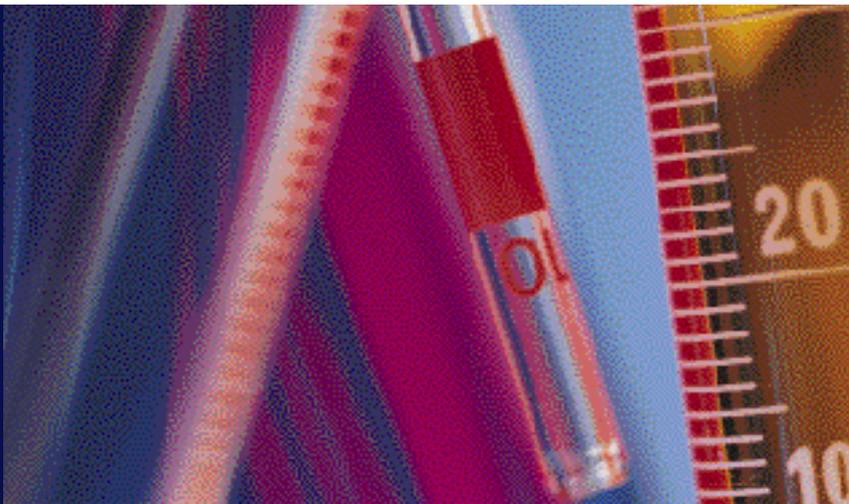


Tabela 1. Erros experimentais relacionados com o ajuste do menisco (adaptado da norma ISO 4787).

Erro na posição do menisco	Diâmetros típicos de meniscos			
	5 mm	10 mm	20 mm	30 mm
0,05 mm	0,001 ml	0,004 ml	0,016 ml	0,035 ml
0,1 mm	0,002 ml	0,008 ml	0,031 ml	0,071 ml
0,5 mm	0,010 ml	0,039 ml	0,157 ml	0,353 ml
1 mm	0,020 ml	0,078 ml	0,314 ml	0,707 ml
2 mm	0,039 ml	0,157 ml	0,628 ml	1,414 ml

Tabela 2. Relação entre o erro na posição do menisco e a tolerância dos instrumentos utilizados. As tolerâncias consideradas são as que estão definidas nas normas ISO aplicáveis aos instrumentos mencionados.

Instrumento	Tolerância da classe A	Erro na posição do menisco (% da tolerância)			
		0,1 mm	0,5 mm	1 mm	2 mm
Pipeta volumétrica de 20 ml	0,03 ml	7%	33%	67%	130%
Bureta de 10 ml, divisão 0,02 ml	0,02 ml	10%	50%	100%	195%
Balão volumétrico de 20 ml	0,04 ml	20%	98%	195%	393%
Bureta de 25 ml, divisão 0,1 ml	0,05 ml	16%	78%	156%	314%
Balão volumétrico de 500 ml	0,25 ml	12%	63%	126%	251%
Balão volumétrico de 2000 ml	0,6 ml	12%	59%	118%	236%

Tabela 3. Erros associados ao tamanho do instrumento seleccionado para medir 100 µl. Sendo E o erro relativo¹ (ou desvio) e CV o coeficiente de variação² máximos especificados pelo fabricante para o instrumento novo.

Instrumento	Fabricante 1		Fabricante 2	
	E (µl)	CV (µl)	E (µl)	CV (µl)
Pipeta de volume fixo de 100 µl	0,6	0,2	0,9	0,3
Pipeta de volume variável de 10 a 100 µl	0,8	0,15	0,8	0,3
Pipeta de volume variável de 100 a 1000 µl	1,6	0,3	0,9	0,45

1 O erro relativo é o erro sistemático expresso como percentagem do volume seleccionado (V_0), de acordo com a equação:

$$E = [(V - V_0) / V_0] \cdot 100$$

2 O coeficiente de variação dado pela equação $CV = 100s / \bar{V}$ é uma medida da repetibilidade da micropipeta, obtida com base no desvio padrão s , das medições efectuadas.

Apesar dos instrumentos de boa qualidade serem fabricados em vidros borosilicatados de grande resistência química, a sua superfície é degradada em contacto com bases fortes e compostos contendo fluoretos, pelo que se deve evitar o contacto prolongado destes compostos com o vidro. É importante lembrar que muitos detergentes utilizados nos laboratórios são fortemente alcalinos e portanto não devem ser deixados em contacto prolongado com os instrumentos volumétricos de vidro. Como é evidente devem também ser evitados os choques térmicos e mecânicos.

Inspeccionar e/ou calibrar a vidraria volumétrica

A vidraria volumétrica deve ser periodicamente sujeita a uma inspeção visual para detectar sinais de degradação, como por exemplo: riscos profundos provocados por escovilhões, pontas lascadas em buretas e pipetas, superfície fosca revelando abrasão. Deve também ser verificada a estanquidade das torneiras das buretas, pois a perda de uma gota é, em regra, superior à tolerância do próprio instrumento. Aperiodicidade desta inspeção deverá ser estabelecida em função da frequência e tipo de utilização dos instrumentos, mas o período entre inspeções não deverá ser superior a um ano.

Do mesmo modo, a periodicidade de calibração dos instrumentos deve ser estabelecida em função da respectiva utilização. No caso de instrumentos que sejam utilizados com soluções pouco agressivas, regularmente inspeccionados, são geralmente aceites períodos de calibração até cinco anos.

Instrumentos volumétricos accionados por êmbolo (POVA)

A escolha de um POVA (macro e micropipetas, buretas digitais, doseadores e diluidores) para um determinado trabalho é decisiva na qualidade dos resultados. Tomemos como exemplo uma medição de 100µl, em que podemos usar diversas micropipetas e supondo em óptimo estado, e podemos mesmo assim obter resultados muito diferentes conforme o tamanho do instrumento seleccionado, tal como se pode ver na tabela 3.

Manipulação do POVA

A primeira medida para utilizar bem um POVA (*Plunger Operated Volumetric Apparatus*) é ler atentamente o manual, dado que a maioria dos manuais destes instrumentos faz referência às principais causas de erro. Além disso, é sempre necessário ter em atenção que no doseamento de pequenos volumes, a temperatura e a humidade do laboratório são muito importantes devido às perdas por evaporação. Nas buretas e doseadores deve ainda tomar-se atenção ao efeito da última gota e em certos instrumentos ao efeito de retorno.

Inspecção e/ou calibração do POVA

Todos os instrumentos com êmbolo devem ser regularmente inspecionados e deve verificar-se se a acção do êmbolo é suave. Se um êmbolo se move "aos solavancos" existe certamente uma perda de exactidão e repetibilidade, muito provavelmente devida a sujidade e/ou falta de lubrificação.

Num estudo efectuado em 2002 sobre pipetas de laboratórios portugueses, 49% careciam de limpeza, lubrificação e/ou ajuste. Apenas 33% das pipetas estudadas cumpriam as especificações para E e CV definidas na norma ISO 8655.

As pipetas devem ser examinadas regularmente para se verificar se existem falhas de estanquicidade devidas, por exemplo, à degradação dos vedantes (*O-ring*) ou dos cones. As buretas e doseadores devem ser inspecionados frequentemente para se avaliar o estado das válvulas e dos tubos de aspiração. Nos instrumentos que utilizam baterias estas devem ser substituídas com a regularidade estabelecida pelo fabricante e não devem ser usados após o aviso de bateria fraca.

Quanto aos intervalos entre calibrações, estes devem ser estabelecidos em função da utilização e do historial do instrumento. É consensual que, para instrumentos com uma manutenção adequada e observância das boas práticas de utilização, o intervalo inicial entre calibrações seja, regra geral, de um ano.

Concluindo, os laboratórios nos quais as medições de volumes são relevantes para a exactidão e repetibilidade dos resultados dos ensaios deverão estabelecer programas de formação específicos para a área da utilização de técnicas de medição de volumes, bem como planos de manutenção, inspecção e calibração dos instrumentos segundo o tipo de utilização a que estão associados.

BIBLIOGRAFIA

- ASTM E542 – 2001. **Standard Practice for Calibration of Laboratory Volumetric Apparatus.**
 ISO 384 – 1978. **Laboratory glassware – Principles of design and construction of volumetric glassware.**
 ISO 385 - 1984. **Laboratory glassware – Burettes.**
 ISO 648 - 1977. **Laboratory glassware – One-mark pipettes.**
 ISO 835 – 1981. **Laboratory glassware – Graduated pipettes.**
 ISO 1042 – 1998. **Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks.**
 ISO 4787 – 1984. **Laboratory glassware – Volumetric glassware - Methods for use and testing of capacity.**
 ISO 8655 – 2002. **Piston-operated volumetric apparatus.**
 Faria, I.; Marques, A. – 2002. **Micropipetas nos laboratórios portugueses – Até que ponto podemos confiar no seu desempenho?**. In: Laboratórios de Portugal, vol.1. p.48-49.

Conselhos para utilizar bem as suas micropipetas

Escolha a ponta correcta e adapte-a firmemente.

A ponta deve estar bem adaptada para evitar falhas de estanquicidade.

Escolha o modo de funcionamento correcto.

Utilize o "modo inverso" só para amostras viscosas.

Pré-humedeça a ponta.

Antes de retirar a amostra aspire e expire pelo menos 3 vezes para formar uma camada de amostra aderente ao interior da ponta.

Recolha a amostra no seu centro e não mergulhe a ponta em demasia.

Observe a profundidade de recolha da amostra especificada pelo fabricante da pipeta.

Mova o êmbolo com suavidade e velocidade constante.

Não deixe o êmbolo subir livremente.

Faça uma pequena pausa após a imobilização do êmbolo.

Após a imobilização do êmbolo ainda existe algum fluxo de amostra para o interior da ponta.

Retire a pipeta lentamente do recipiente que contém a amostra.

A remoção brusca origina volumes demasiado baixos.

Evite inclinar demasiado (ou deitar) uma pipeta enquanto contém amostra.

A amostra pode penetrar no cone, sendo fonte de contaminações e obstruções indesejáveis.

Observe a ponta antes de dispensar a amostra.

As eventuais gotas aderentes ao exterior da ponta devem ser removidas.

Observe a ponta depois de dispensar a amostra.

Eventuais gotas retidas no interior da ponta fazem parte do volume medido, significando que a ponta foi reutilizada ou é de má qualidade.

Evite agarrar a pipeta pela parte inferior e pause-a entre duas utilizações.

A transferência de calor das mãos para a pipeta deve ser minimizada.

Não reutilize as pontas.

