

METODOLOGIAS DE VALIDAÇÃO NA CALIBRAÇÃO DE INSTRUMENTOS VOLUMÉTRICOS

Elsa Batista, Eduarda Filipe, Miguel Azevedo
Instituto Português da Qualidade, Rua António Gião, 2 - 2829 Caparica

Palavras Chave: Gravimetria, Validação, Incerteza, Material volumétrico de vidro, Micropipetas

Resumo

Este trabalho tem como objectivo a validação do método gravimétrico aplicado á calibração de material volumétrico de vidro e micropipetas utilizados em laboratórios analíticos, através de vários tipos de metodologias experimentais, onde o volume de cada instrumento volumétrico é assim determinado através do cálculo da massa de água destilada contida ou escoada desse instrumento, em condições ambientais controladas.

Introdução

Os instrumentos volumétricos são essenciais para qualquer laboratório ou indústria que pretenda uma correcta medição do volume, podendo ter uma grande influência no resultado final de um ensaio onde a medição do volume é apenas um pequeno componente de uma série de etapas experimentais.

A calibração de instrumentos volumétricos, visando a quantificação de diferenças, entre o valor nominal e o valor verdadeiro, é do ponto vista tecnológico de grande interesse, porque contribui para a compreensão dos erros sistemáticos do processo analítico de medição, sendo assim possível proceder á sua correcção.

Na determinação do erro de medição dos instrumento volumétricos é utilizado o método gravimétrico, que consiste na determinação da massa de líquido escoado ou contido no instrumento a calibrar e que é posteriormente convertida em volume através de fórmulas adequadas descritas na literatura.

Neste trabalho o método gravimétrico, aplicado á determinação do volume, foi validado utilizando diferentes metodologias de acordo com os instrumentos a calibrar (balões volumétricos, provetas, pipetas, buretas, picnómetros e micropipetas) e as condições de trabalho do laboratório, utilizando diferentes operadores, diferentes líquidos de calibração, diferentes tempos de estabilização e procedimentos experimentais distintos.

Foram também realizados testes de desempenho aos vários instrumentos volumétricos utilizados de forma a se avaliar a possível variação de resultados perante situações que se encontram fora do método experimental validado.

O balanço de incertezas para cada uma das metodologias é apresentado adoptando os modelos matemáticos de E. Batista *et al* [1].

Validação do Método

A validação é confirmação, através de evidência objectiva, de que foram satisfeitos os requisitos para uma utilização ou aplicação específicas. [2]

No processo de validação o método é avaliado em termos da sua representatividade, reprodutibilidade e repetibilidade. As técnicas de validação baseiam-se [3]:

- Na utilização da calibração;
- Em comparações interlaboratoriais incluindo o uso de materiais de referência e métodos de referência;
- No pessoal qualificado e o seu julgamento profissional;
- Na modelação e simulação.

Poderemos caracterizar os diferentes procedimentos de validação através de uma abordagem científica ou comparativa. No caso de ser uma validação científica pode ser baseada em informação publicada na literatura ou publicações do laboratório sobre o desenvolvimento do método. O laboratório tem de demonstrar que os factores relevantes foram analisados e estão sobre controlo dentro da incerteza associada com o método. Para a validação comparativa o método de teste será aceite comparando os resultados com outros obtidos através de um método já validado que foi desenvolvido para o mesmo propósito. Se isto não for possível a *performance* do teste pode ser avaliada por comparações interlaboratoriais. O método pode ser considerado validado se os resultados obtidos estiverem dentro dos limites esperados para a incerteza.

No caso específico da calibração de instrumentos de volumétricos a validação do método gravimétrico pode ser efectuada utilizando ambos os procedimentos.

Método Experimental

A gravimetria é a determinação da massa de água escoada ou contida no recipiente a calibrar na qual se realizam duas pesagens uma com o recipiente cheio e outra com o recipiente vazio, utilizando água como líquido de calibração, à temperatura de referência de 20 °C.

Para determinar qual o volume correspondente à massa escoada ou contida utiliza-se a seguinte fórmula descrita na ISO 4787 [4].

$$V_{20} = (I_L - I_E) \times \frac{1}{\rho_W - \rho_A} \times \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_B}\right) \times [1 - \gamma(t - 20)]$$

Nesta equação temos:

V_{20} - volume, à temperatura de 20 °C, em ml

I_L - resultado da pesagem com o recipiente cheio com água, em g

I_E - resultado da pesagem com o recipiente vazio, em g

ρ_W - massa volúmica da água, à temperatura de calibração t , em g/ml

ρ_A - massa volúmica do ar, em g/ml

(para temperaturas muito próximas de 20 °C e à pressão atmosférica normal pode ser usado o valor médio de 0,0012 g/ml)

ρ_B - massa volúmica de referência das massas da balança

(para massas conformes com a OIML 33, normalmente utilizados, este valor é de 8,0 g/ml)

γ - coeficiente de expansão cúbica do material de que é feita a esfera, em °C⁻¹

t - temperatura da água utilizada na calibração, em °C

Cálculo da incerteza

Para se calcular a incerteza do volume obtido deve-se ter em conta os factores que vão influenciar essa medição ou seja os componentes de incerteza.

O cálculo da incerteza na calibração de equipamento volumétrico é semelhante ao descrito no trabalho de E. Batista *et al* [1] onde os componentes da incerteza são os seguintes:

- a incerteza da pesagem, $u(m)$;
- a incerteza da massa volúmica da água $u(\rho_w)$, dos pesos da balança $u(\rho_B)$ e do ar $u(\rho_A)$;
- a incerteza da temperatura $u(t)$;
- a incerteza do menisco u_{men} ;
- a incerteza do coeficiente de expansão cúbica do material $u(\gamma)$;
- a incerteza da evaporação u_{evap} no caso específico de micropipetas.

Assim a fórmula para o cálculo da incerteza combinada é a seguinte:

$$u(V_{20}) = \left[\left(\frac{\partial V_{20}}{\partial m} \right)^2 u^2(m) + \left(\frac{\partial V_{20}}{\partial \rho_w} \right)^2 u^2(\rho_w) + \left(\frac{\partial V_{20}}{\partial \rho_A} \right)^2 u^2(\rho_A) + \left(\frac{\partial V_{20}}{\partial \rho_B} \right)^2 u^2(\rho_B) + \left(\frac{\partial V_{20}}{\partial \gamma} \right)^2 u^2(\gamma) + \left(\frac{\partial V_{20}}{\partial t} \right)^2 u^2(t) + u^2(V_{men}) \right]^{\frac{1}{2}}$$

A incerteza combinada é de seguida multiplicada por um factor de conversão k (normalmente é igual a 2 para um número de graus de liberdade superior a 50) para se obter a incerteza padrão expandida que corresponde a um intervalo de confiança de 95% [5].

Resultados Experimentais

Validação do método de calibração de material volumétrico de vidro

Sendo a gravimetria um método normalizado é necessário verificar se o laboratório efectuou uma análise do funcionamento do método para a calibração de material volumétrico de vidro nas condições de trabalho do laboratório dentro da incerteza associada com o método. Assim foram realizados ensaios com diferentes operadores, diferentes líquidos de calibração e diferentes tempos de estabilização.

Diferentes operadores

De forma a se poder verificar a reprodutibilidade do método foram calibrados diferentes tipos de material volumétrico de vidro por dois metrologistas diferentes. Os resultados são apresentados na tabela seguinte:

Tabela 1 – Estudo de reprodutibilidade

	Balão de 100 ml		Pipeta de 10 ml		Bureta de 50 ml		Picnómetro de 50 ml		Proveta de 25 ml	
	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)
Metrologista 1	99,985	0,004	10,003	0,003	50,034	0,004	49,886	0,003	25,085	0,004
Metrologista 2	99,990	0,003	10,001	0,005	50,027	0,004	49,886	0,003	25,089	0,003
Variação	0,005		0,002		0,007		0,000		0,003	

Os valores médios do volume são bastante semelhantes entre si tendo em conta a incerteza de cada resultado o que indica que o método é reprodutível.

Diferentes líquidos de calibração

Com este estudo pretende-se verificar a variação no valor do volume e da incerteza na calibração do material volumétrico com a utilização de diferentes líquidos de calibração, tais como a água e nonano.

Tabela 2 – Estudo da influência do líquido de calibração

	Balão de 100 ml		Pipeta de 10 ml		Bureta de 50 ml		Picnómetro de 50 ml		Proveta de 25 ml	
	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)	Volume (ml)	Incerteza (ml)
Água	99,985	0,004	10,003	0,003	50,014	0,004	49,886	0,003	25,085	0,004
Nonano	99,966	0,020	9,991	0,011	49,999	0,011	49,863	0,015	25,061	0,011
Variação	0,019		0,012		0,015		0,013		0,014	

Verifica-se que existe uma sobreposição dos valores obtidos se tivermos em conta a sua incerteza, apesar disso pode-se afirmar que existe uma clara diferença entre os volumes obtidos quando se utiliza o nonano em vez da água. Esta diferença deve-se possivelmente ao facto da determinação da densidade do nonano só ser possível numa gama restrita de temperaturas o que provoca a necessidade de extrapolação para a gama de trabalho e consequente diminuição da exactidão de resultados. A incerteza também é maior no caso do nonano devido a uma maior variação de temperatura durante os ensaios provocada pela instabilidade do líquido e pela sua maior capacidade de absorver calor.

Diferentes tempos de estabilização

De acordo com a norma ISO 4787 o tempo de estabilização do material no laboratório antes de uma calibração deve ser de 24 h. Com este estudo pretende-se verificar que este dado é aplicável às condições existentes no laboratório. Foi colocado um balão de 500 ml a 50 °C e uma pipeta de 10 ml a 0 °C durante 24 h e verificou-se a variação do volume com diferentes tempos de estabilização. O ensaio ao “tempo zero” corresponde a um tempo de estabilização de 24 h.

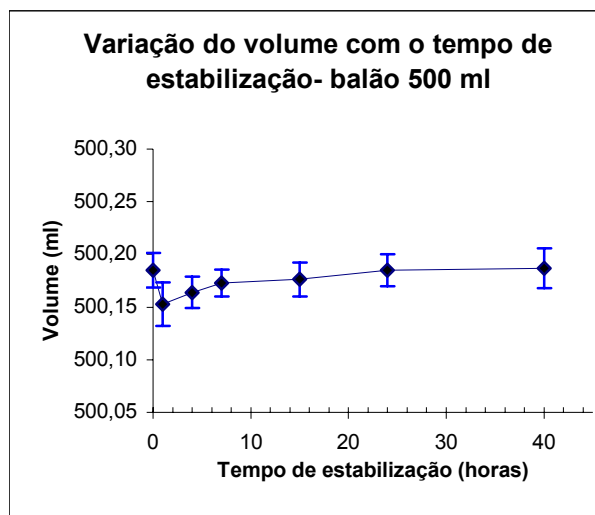


Figura 1— Balão de 500 ml colocado a 50 °C

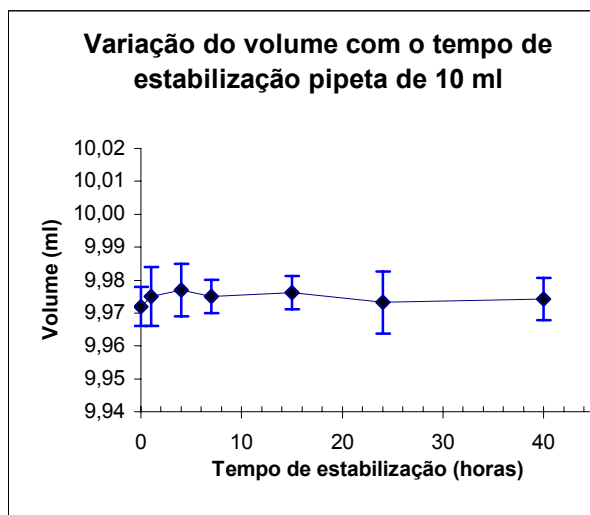


Figura 2 – Pipeta de 10 ml colocada a 0 °C

Verificou-se que no caso do balão houve uma diminuição inicial do volume devido á evaporação que ocorre devido à temperatura do vidro ser ainda elevada com pouco tempo de estabilização. Ao longo do tempo este volume vai aumentando e estabiliza perto das 24 h.

No caso da pipeta não existem diferenças significativas entre os diferente períodos de estabilização mas o que mais se aproxima do valor inicial é o tempo de estabilização de 24 h.

Validação do método de calibração de micropipetas

A calibração de micropipetas pode ser efectuada através de quatro métodos gravimétricos diferentes descritos em normas ISO. Neste pretende-se demonstrar qual o melhor método a utilizar sendo este validado por comparação com os outros.

Diferentes métodos experimentais

O primeiro método, o método normal, é baseado na ISO 4787 e na ISO 8655 [6] onde se determina-se o peso do recipiente de medida seco e pipeta-se o volume pretendido. Pesa-se o recipiente com água e por diferença determina-se o valor do volume da micropipeta. O recipiente é limpo depois de cada adição de liquido sendo o procedimento repetido dez vezes.

O segundo método é o método de evaporação baseado apenas na norma ISO 8655. Determina-se o peso do recipiente com 3 mm de água (m_0). Liga-se um cronómetro e pipeta-

se o volume pretendido. O recipiente é pesado novamente (m_1), pipetando-se de seguida o volume pretendido (m_2). A massa obtida por diferença (m_1-m_0 , m_2-m_1 , ..., $m_{10}-m_9$) é uma medida do volume da micropipeta. Faz-se de seguida uma correcção á evaporação deixando-se o recipiente na balança durante o tempo indicado pelas dez medições, adicionando o valor médio obtido a cada um dos ensaios.

O terceiro método é o método sem evaporação, também baseado na norma ISO 8655 mas onde não se contabiliza as perdas por evaporação. Determina-se o peso do recipiente com 3 mm de água e pipeta-se o volume pretendido. Pesa-se o recipiente com água e por diferença determina-se o valor do volume da micropipeta. Repetem-se os ensaios dez vezes sem limpar o recipiente. Regista-se o valor da massa em cada medição.

O último método é o método sem evaporação utilizando óleo. Este método é bastante semelhante ao terceiro e também baseado na ISO 8655. Coloca-se no recipiente 5 mm de óleo, determina-se o seu peso e pipeta-se o volume pretendido de forma a que a água fique por baixo do óleo que possui uma densidade menor. Pesa-se novamente o recipiente e determina-se o volume da micropipeta repetindo-se o procedimento. Regista-se o valor da massa em cada medição.

Foram realizados cinco ensaios para cada micropipeta de 5 μ l e de 100 μ l, para os quatro métodos. Cada ensaio compreende dez medições.

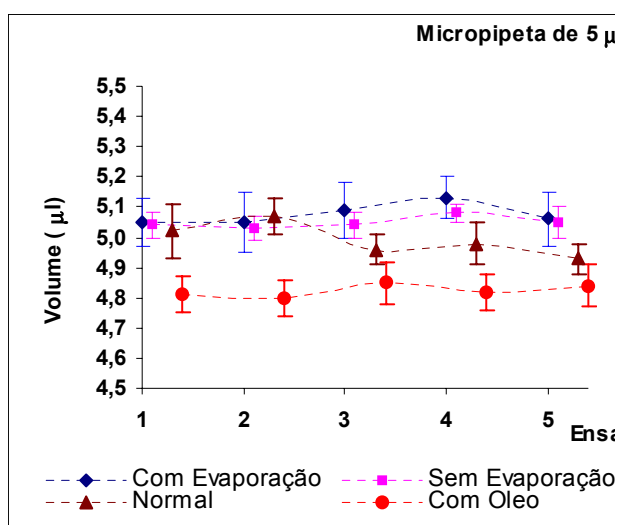


Figura 3 – Calibração de uma micropipeta de 5 μ l

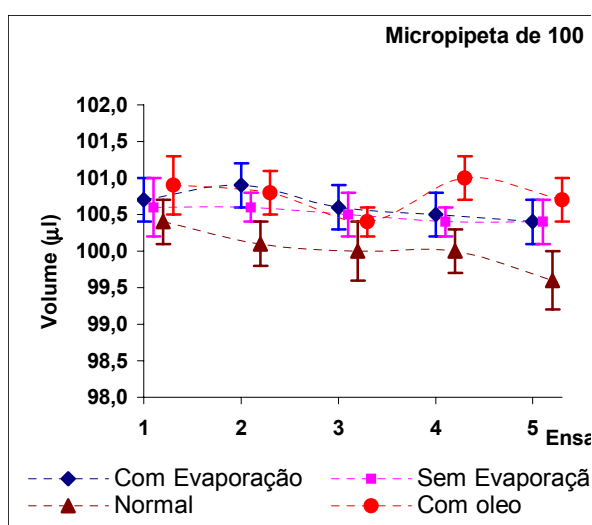


Figura 4 – Calibração de uma micropipeta de 100 μ l

Como se pode observar pelas figuras 3 e 4, o método com maior repetibilidade e com a menor incerteza é o método sem evaporação. Este é também o método mais rápido e mais fiável visto que não temos tempos de espera durante o procedimento. Além disso não necessita de correcções ao volume ou limpeza do recipiente com solventes de forma a se remover o óleo utilizado.

Ensaio de desempenho

Foram efectuados vários ensaios de desempenho a instrumentos volumétricos de forma a se avaliar as possíveis alterações dos resultados quando o instrumento é utilizado correntemente nos laboratórios dos clientes, simulando condições de funcionamento que estão fora do procedimento validado.

Micropipetas

Foram efectuados dois ensaios de desempenho a uma micropipeta de 1000 μl para se avaliar a sua resposta em condições de fadiga e sem substituição das pontas. No primeiro caso foram realizadas 100 medições consecutivas. No caso das pontas a micropipeta foi calibrada sempre com a mesma ponta cinco vezes. Cada ensaio tem dez medições.

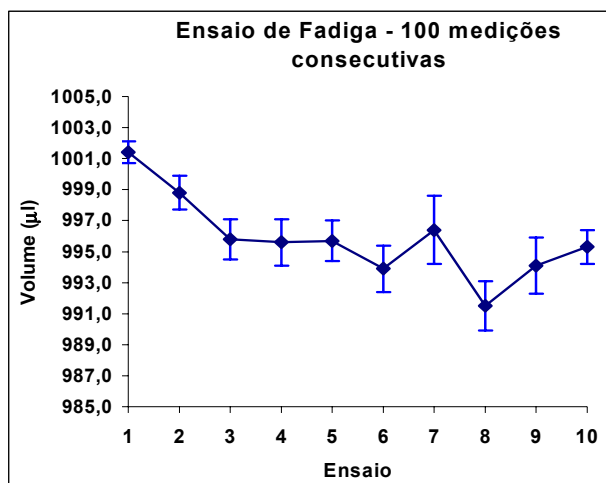


Figura 5 – Ensaio de Fadiga

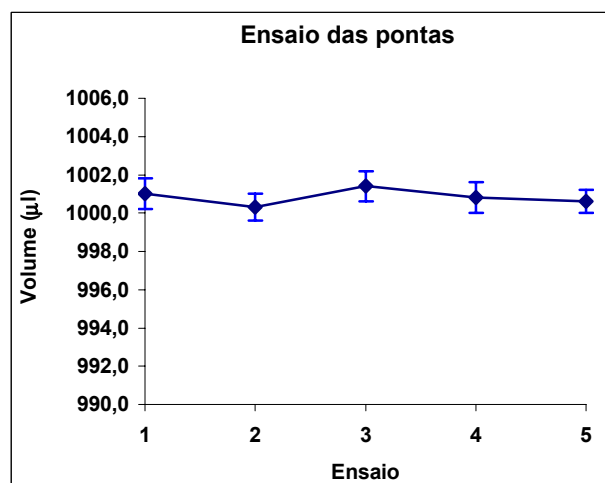


Figura 6 – Ensaio das pontas

Como se pode observar pelas figuras, no ensaio de fadiga a micropipeta necessita de algum tempo para recuperar depois de uma utilização continuada. O volume vai diminuindo ao longo das 100 medições (figura 5) possivelmente devido a uma deficiente aspiração do líquido, pois o êmbolo não consegue voltar à posição inicial.

Para o ensaio das pontas (figura 6), verifica-se que se a mesma ponta for utilizada em todas as medições, não existe alteração de volume, mas é mais seguro proceder à sua substituição em cada medição, porque se existir algum defeito de fabrico, que pode influenciar o resultado, pode não ser identificado durante os ensaios. Outro problema que pode ocorrer se não houver substituição de pontas é o da contaminação no caso de medições químicas ou biológicas.

Material volumétrico de vidro

O material de vidro dilata com o calor devido ao seu coeficiente de expansão. É do conhecimento geral que o material volumétrico usado em laboratório é normalmente seco em estufas. Foi então verificar-se a influência do tempo de aquecimento no aumento do volume do instrumento a calibrar colocando-se um balão de 500 ml e uma pipeta de 10 ml numa estufa a 50 °C durante 5 h, 24 h, 48 h, 72 h e 92 h.

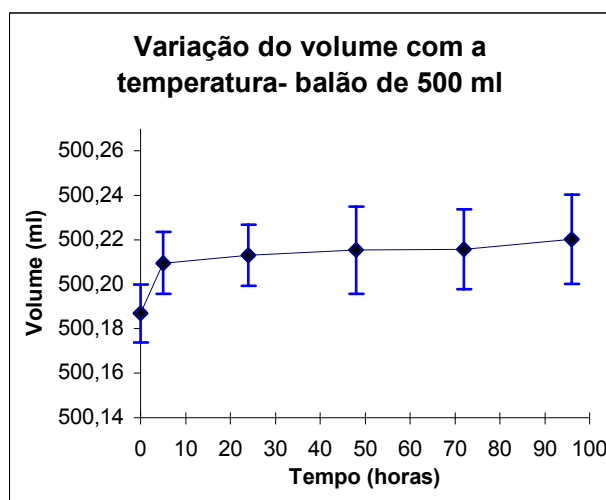


Figura 7 – Balão de 500 ml

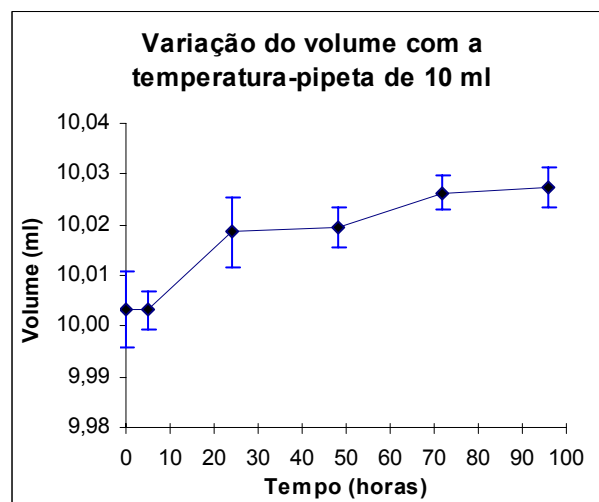


Figura 8 – Pipeta de 10 ml

Verifica-se em ambos os casos um aumento gradual do volume com o tempo de exposição a 50 °C.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos pode concluir que o método gravimétrico aplicado á calibração de instrumentos volumétricos foi validado através de ensaios com diferentes operadores, diferentes líquidos de calibração, diferentes tempos de estabilização e diferentes procedimentos experimentais. Verifica-se também que é necessário algum cuidado no manuseamento deste tipo de instrumento visto que os ensaios de desempenho indicam claramente que as micropipetas não deverão ser utilizadas continuamente sem nenhum intervalo de espera, devido à fadiga do êmbolo, que irá levar a resultados de medição de volume incorrectos e que o aquecimento do material de vidro em estufas provoca uma alteração de volume que pode ser significativo para alguns ensaios analíticos.

Referências

- (1) – E. Batista, A. Sabrosa, M.C. Ferreira, I. Castanheira, A.M.H. van der Veen, *Uncertainty Calculation in the Calibration of Volumetric Laboratory Glassware*, IX Congresso Internacional de Metrologia, Brasil (2000);
- (2) – ISO 9000:2000 *Sistemas de gestão da qualidade. Fundamentos e vocabulário* (2000);
- (3) – S. Ellison, A. Williams, *Measurement uncertainty and its implications for collaborative study method validation and Method performance parameters*, Accred Qual Assur, 3:6-10 (1998);
- (4) – ISO 4787 *Laboratory glassware - Volumetric glassware - Methods for use and testing of capacity* (1984);
- (5) – Guia para a expressão da incerteza de medição nos Laboratórios de Calibração, IPQ (1998);
- (6) – ISO 8655-1/2/6 - *Piston-operated volumetric apparatus* (2002);
- (7) – E. Batista, L. Pinto, E. Filipe, A.M.H. van der Veen, - *Calibration of micropipettes : test methods and uncertainty calculation*, Congresso de Metrologia, Toulon (2003).