

INTEOTEC

USO CORRETO DE PIPETAS

MATERIAL VOLUMÉTRICO

Os instrumentos de medição são essenciais para qualquer laboratório ou indústria que necessita de medições corretas de volumes. A qualidade dos resultados das análises é dependente da exatidão com que são medidos os volumes das amostras ensaiadas ou dos reagentes adicionados.

Estes instrumentos de medição devem ser escolhidos levando-se em consideração sua aplicação. Mesmo os mais sofisticados instrumentos automáticos de análise oferecem resultados confiáveis somente quando o material volumétrico empregado na preparação de reagentes e amostras for suficientemente preciso e direcionado ao uso pretendido.

A calibração e o uso adequado dos instrumentos de medição têm grande influência no resultado final de um ensaio. É importante avaliar e reduzir, onde for possível, os erros sistemáticos e aleatórios que possam influenciar o bom desempenho do laboratório.

PIPETAS

Pipetas são usadas para transferência de volumes pré-estabelecidos de um recipiente para outro. Para os diversos usos em laboratórios clínicos ou laboratórios de análise em geral, existem diversos tipos de pipetas, como as pipetas de vidro e pipetas automáticas (mecânicas e eletrônicas).

Pipeta Volumétrica ou Transferidora: planejada para medir um volume fixo de líquido, constituindo-se de um bulbo cilíndrico contendo um tubo estreito em cada extremidade (Figura 1 A). A marca de calibração do volume fica gravada na parte superior do tubo. A parte inferior do tubo se afina gradualmente, de modo que o calibre interno na extremidade da pipeta seja suficientemente fino para que o fluxo do líquido e a drenagem incompleta não causem erros de medição além da tolerância especificada.

Estas pipetas são calibradas para utilização em medida de amostras não viscosas. A exatidão da calibração desta pipeta é diretamente proporcional à sua capacidade.

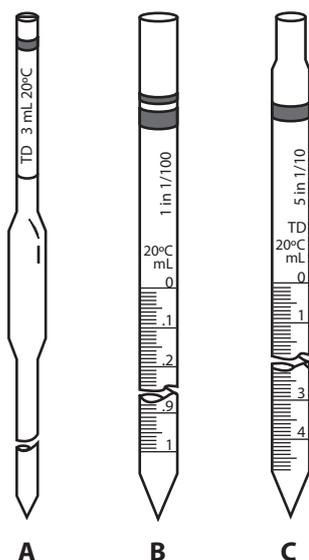


Figura 1: A: Pipeta Volumétrica; B: Pipeta Mohr (escoamento parcial); C: Pipeta sorológica (escoamento total)

Pipeta Graduada ou Medidora: Consiste em um tubo de vidro graduado uniformemente em seu comprimento (Figura 1 B e 1C). Existem 2 tipos:

- Pipeta graduada de escoamento parcial: calibrada entre duas marcas, apresenta no topo duas linhas coloridas;
- Pipeta graduada de escoamento total (sorológica), graduada até a extremidade inferior, apresenta no topo uma linha colorida.

Estas pipetas são planejadas para medidas de volumes pré-determinados e não são consideradas exatas para medir amostras e padrões.

CUIDADOS NECESSÁRIOS PARA USO CORRETO DAS PIPETAS

- Não pipetar com a boca. Utilizar sempre um dispositivo para a pipetagem (Figura 2);
- Utilizar pipetas integras, descartar as pipetas que apresentem pontas quebradas;
- Utilizar pipetas limpas e secas;
- Utilizar pipetas com volume total o mais próximo possível do volume a ser medido;
- Para medidas de soluções viscosas, evitar que o líquido ultrapasse muito a marca de medida, limpar a parte externa da pipeta e lavar a mesma várias vezes na solução que irá receber o material pipetado;
- Nas soluções incolores coloca-se o menisco inferior na marca de calibração enquanto que nas soluções coradas o acerto se faz na parte superior do menisco (Figura 3);
- Os olhos devem estar posicionados na altura da leitura do menisco (Figura 4);
- Utilizar a pipeta sempre na posição vertical (tanto para aspirar como para desprezar o líquido);
- O fluxo do líquido deve ser contínuo.

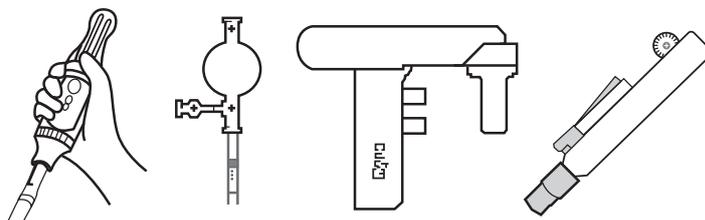


Figura 2: Dispositivos auxiliares para pipetar.

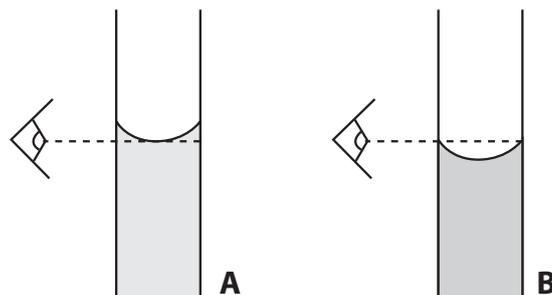


Figura 3: Acerto do menisco. A: soluções incolores; B: soluções coradas.

Evitando a paralaxe.

A superfície de um líquido confinado num tubo estreito exibe uma curvatura marcante, ou menisco, que consiste na interface entre o ar e o líquido a ser medido. Para acerto do menisco, seu olho deve estar no nível da superfície do líquido para assim evitar um erro devido à paralaxe (Figura 4). Paralaxe é um fenômeno que ocorre através da observação errada do valor na escala analógica do instrumento, devido ao ângulo de visão.

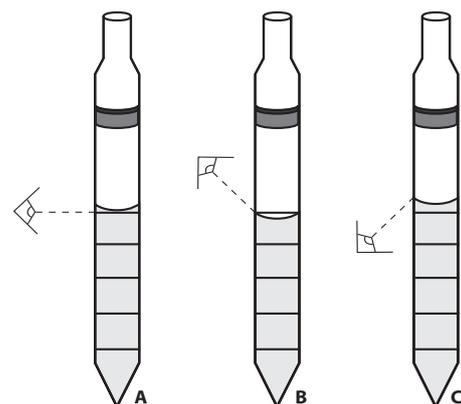


Figura 4: A: posição correta para acertar o menisco. B e C posições erradas para acertar o menisco.

PIPETAS AUTOMÁTICAS

As micropipetas são instrumentos de laboratório utilizados para transferência com precisão, de pequenos volumes de líquido.

Podem ser simples, que só empregam uma ponteira (Figura 5B) ou multicanal (Figura 5C), que permitem uso de várias ponteiras simultaneamente, pipetando o mesmo volume em todas elas.

De modo geral são utilizadas para pipetar volumes de 1 a 1000 microlitros.

Existem dois tipos de pipetas: Pipetas de deslocamento de ar (Figura 5B e 5C) para uso geral e Pipetas de deslocamento positivo (Figura 5A), para manuseio de líquidos específicos (densos, viscosos ou voláteis). Os dois tipos de pipetas são disponibilizados em volumes variáveis ou fixos.

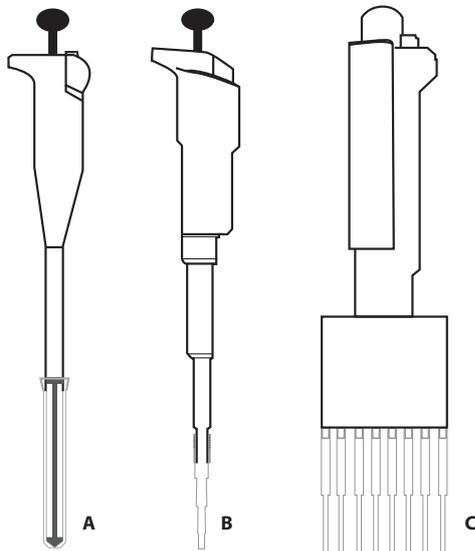


Figura 5: A – Pipeta de Deslocamento Positivo; B – Pipeta Deslocamento de Ar (monocanal) e C – Pipeta Deslocamento de Ar (multicanal).

CUIDADOS NECESSÁRIOS PARA USO CORRETO DAS PA

- Para o uso adequado das pipetas automáticas, visando obter precisão e exatidão, é necessário primeiramente que as pipetas e ponteiras sejam de qualidade, que se tenha suficiente experiência prática em seu uso correto e que a manutenção e calibração estejam em conformidade com as orientações do fabricante.
- Ponteiras de má qualidade podem ter rebarbas ou ondulações no plástico que retêm líquidos, de modo que o volume pipetado não é o volume dispensado. Outro problema no uso de ponteiras de má qualidade é a abertura não concêntrica da ponta da ponteira, afetando a distribuição do líquido na ponteira.
- Nunca mover a pipeta da posição vertical quando estiver com líquido na ponteira.
- Manter a pipeta na posição vertical e efetuar a aspiração do líquido lentamente, dando uma pausa de uma fração de segundos após a aspiração.
- É recomendado que se faça um ambiente na ponteira com o líquido a ser pipetado. Com isto se obtém melhor exatidão e precisão da pipetagem. Sugerimos consultar o manual da pipeta.
- Para pipetagem de amostras viscosas e sangue total, sugerimos limpar com cuidado a parte externa da ponteira e lavar a ponteira no líquido que vai receber a amostra.
- Para prevenir corrosão do pistão, evitar aspirações acidentais do líquido para dentro da pipeta. Se o líquido é acidentalmente aspirado para dentro da pipeta, o pistão deve ser imediatamente limpo com álcool isopropílico a 70% ou de acordo com orientações do fabricante.
- Após o uso as pipetas devem ser mantidas na posição vertical em estantes apropriadas.

PIPETAS DE DESLOCAMENTO DE AR

Para o uso em amostras aquosas de modo geral é utilizada a Pipeta de Deslocamento de Ar, em conjunto com a ponteira descartável (Figura 6). É indicado o uso de ponteiras que se adaptem perfeitamente às pipetas. As ponteiras não devem ser reaproveitadas, pois este procedimento pode levar a erros de pipetagem e a contaminações de amostras e reagentes.

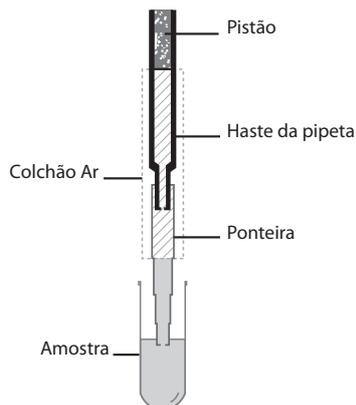
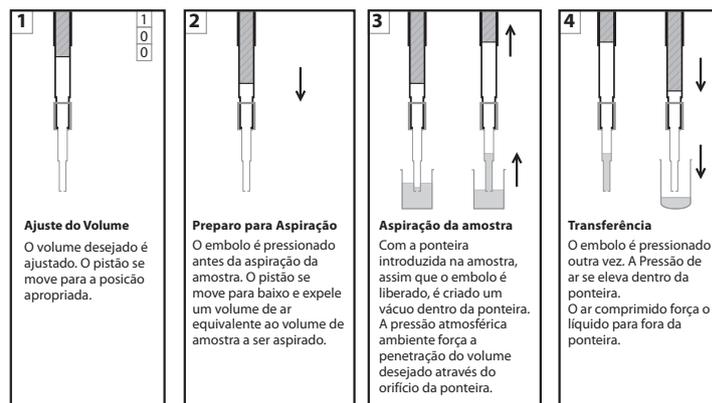


Figura 6: Sistema da Pipeta de Deslocamento de Ar

FUNCIONAMENTO DAS PIPETAS DE DESLOCAMENTO DE AR

Quando o embolo é pressionado em uma pipeta de deslocamento de ar, o pistão dentro do instrumento se move para baixo expulsando o ar, que é deslocado pelo pistão. O volume de ar deslocado pelo pistão é equivalente ao volume de líquido aspirado.

O esquema abaixo demonstra como o pistão determina o volume de ar deslocado e subsequentemente o volume de amostra aspirado.



Modos de Pipetagem

As técnicas de pipetagem mais frequentemente utilizadas são a pipetagem direta e a pipetagem reversa. A seleção da técnica de pipetagem deve ser determinada de acordo com o método requerido.

O modo de operação pode alterar significativamente os resultados de uma análise, portanto o utilizar uma pipeta, é fundamental determinar o melhor modo de operação para a aplicação.

PIPETAGEM DIRETA (ESGOTAMENTO TOTAL)

Um dos fatores que influenciam a precisão da pipetagem é o adequado esvaziamento da ponteira pela pressão de ar.

Reposo
1º Estágio
2º Estágio

*A porção da ponteira imersa na amostra tem efeito significativo na imprecisão das medições. Se a ponteira é imersa profundamente, gotículas da amostra ficarão na parede externa da ponteira e se somarão ao volume transferido. Se a ponteira não é imersa a uma profundidade suficiente, o volume transferido será menor que o volume selecionado.

Volume (microlitro)	Porção imersa (milímetros)
0,1 - 1	1
1 - 100	2 - 3
101 - 1000	2 - 4
> 1001	3 - 6

1 Preparação

Segurar a pipeta próximo à posição vertical. Pressionar suavemente o embolo até a posição do 1º estágio.

2 Aspiração

Imergir a ponteira no líquido*. Liberar o embolo lentamente até a posição de Repouso. Esperar um segundo para permitir que o líquido se acomode dentro da ponteira.

3 Transferência

Colocar a ponta da ponteira a um ângulo (10 a 45°) contra a parede interna do recipiente. Pressionar o embolo suavemente até o 1º estágio. Esperar um segundo.

4 Esgotamento

Deslocar a ponta da ponteira para outra região da parede interna do recipiente. Pressionar o embolo até o 2º estágio, deslocando a ponteira na parede para remover o restante da amostra.

5 Repouso

Liberar o embolo suavemente até a posição Repouso.

PIPETAGEM REVERSA (ESGOTAMENTO PARCIAL)

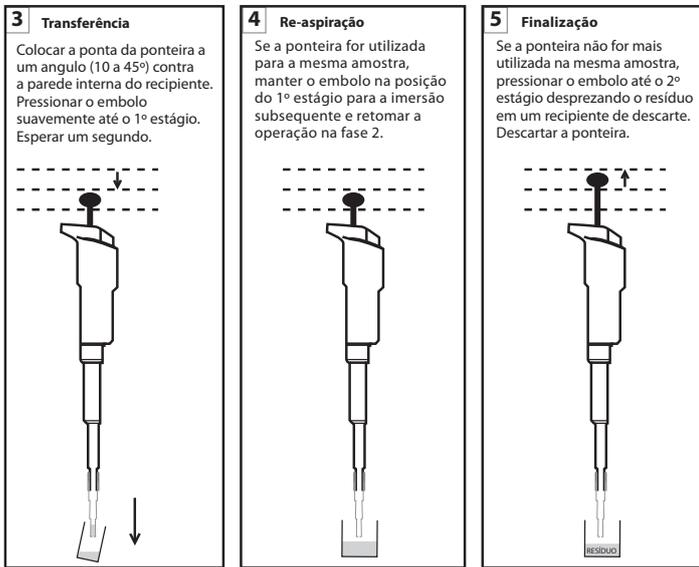
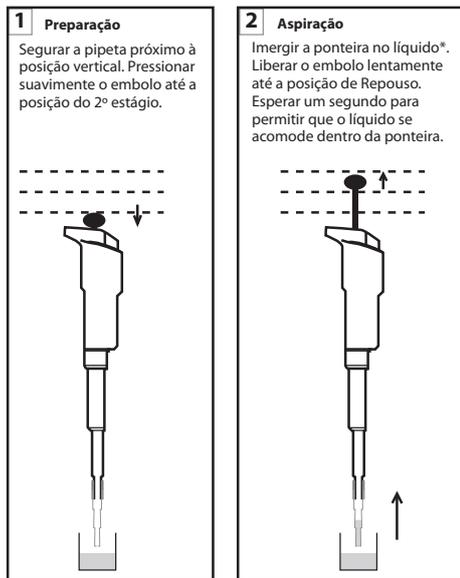
Para pipetagem de amostras viscosas

Um dos fatores que influenciam a precisão da pipetagem é o adequado esvaziamento da ponteira pela pressão de ar.

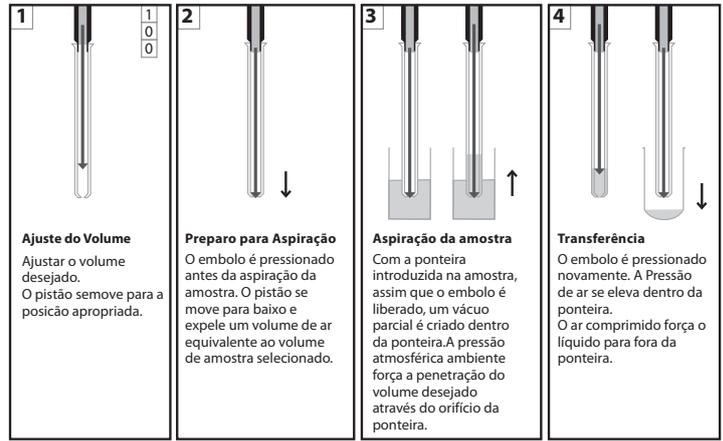
Repouso
1º Estágio
2º Estágio

*A porção da ponteira imersa na amostra tem efeito significativo na imprecisão das medições. Se a ponteira é imersa profundamente, gotículas da amostra ficarão na parede externa da ponteira e se somarão ao volume transferido. Se a ponteira não é imersa a uma profundidade suficiente, o volume transferido será menor que o volume selecionado.

Volume (microlitro)	Porção imersa (milímetros)
0,1 - 1	1
1 - 100	2 - 3
101 - 1000	2 - 4
> 1001	3 - 6



Esquema de funcionamento da pipeta de deslocamento positivo:



CALIBRAÇÃO

Micropipetas são instrumentos de alta precisão constituídos por diversos componentes mecânicos sujeitos ao desgaste após uso prolongado ou disfunção resultante de uso inadequado.

Como a medição de volume é um passo crítico em qualquer laboratório analítico, onde um pequeno erro de pipetagem pode causar um erro significativo no resultado, é essencial a verificação da calibração dos instrumentos volumétricos nas mesmas condições em que são utilizados no laboratório.

A verificação da calibração consiste em estabelecer a relação entre o valor indicado pelo instrumento e o valor efetivamente medido. É essencialmente um conjunto de medições e, como tal, não altera o desempenho do instrumento.

A verificação da calibração deve ser realizada nas seguintes situações:

- Após uma manutenção e troca de peças;
- Quando a pipeta sofre uma queda ou outro dano;
- Mudança no controle da qualidade do sistema analítico;
- De acordo com orientações do fabricante.

A frequência da verificação da calibração depende do quanto a pipeta é utilizada e da qualidade e condição deste uso. A frequência pode ser definida também com base em resultados anteriores e na criticidade da medida.

É importante que na verificação da calibração cada laboratório estabeleça os limites aceitáveis de acordo com suas aplicações. Estes limites geralmente são informados pelo fabricante da pipeta.

Os três métodos mais comuns de calibração de pipetas automáticas são: gravimétrico, titrimétrico e fotométrico.

O método gravimétrico consiste na determinação da massa de líquido escoado ou contido no instrumento a calibrar, tendo em conta a temperatura, umidade, pressão atmosférica e coeficiente de expansão e que é posteriormente convertida em volume através de fórmulas adequadas descritas na literatura. Esta técnica deve ser realizada por laboratório de calibração especializado.

O método titrimétrico consiste na medição de uma quantidade conhecida de NaOH em relação ao volume dispensado pela pipeta. O volume dispensado pela pipeta é determinado sem interferência da temperatura, umidade ou pressão atmosférica. É necessária uma rigorosa padronização das soluções envolvidas.

O método fotométrico consiste em medições de diferentes diluições de amostras e consequente leitura fotométrica destas medições. É um procedimento que pode ser facilmente implantado no laboratório.

Análise dos resultados da calibração

Após a calibração, deve ser feita a análise para verificar se o instrumento cumpre os critérios de aceitação estabelecidos para cada um dos pontos calibrados, com base em especificações do próprio laboratório ou especificações do fabricante, tendo em vista que os erros detectados na calibração não devem invalidar ou afetar significativamente seu uso nos ensaios.

Para fazer a aceitação deve ter-se sempre em conta a incerteza da calibração, usando para tal a equação:

$$|\text{erro}| + |\text{incerteza}| \leq |\text{EMA}|$$

EMA – Erro máximo aceitável.

O laboratório deve definir a frequência da calibração e os limites aceitáveis, deve registrar todas as calibrações realizadas e devidas ações.

Observação

A calibração das pipetas, por si só, não garante a qualidade de seu uso. As pipetas têm que ser mantidas em bom funcionamento através de um programa de manutenção adequado, incluindo limpeza, lubrificação, substituição de vedantes e ajuste. Após a calibração, é necessário verificar se o instrumento cumpre os limites estabelecidos, em função das necessidades específicas do laboratório e do uso a que o instrumento se destina, tendo em conta a incerteza da calibração. Para manter a confiança até a próxima manutenção e calibração deve instituir-se um programa de verificações intermédias.

PIPETAS DE DESLOCAMENTO POSITIVO

Para uso em amostras que tem sua pipetagem dificultada (viscosa, densa, volátil, radioativa, corrosiva) é indicado o uso de pipetas de deslocamento positivo. Neste tipo de pipeta a amostra tem contato direto com o êmbolo que faz parte do pistão descartável (Figura 7).

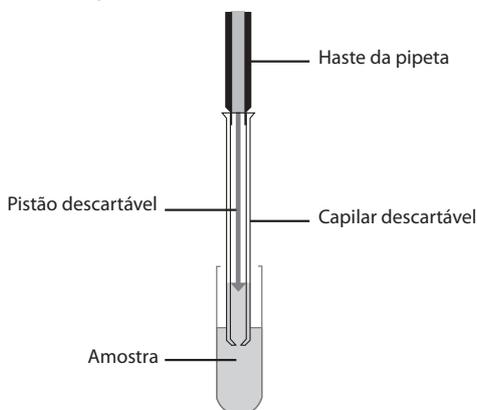


Figura 7: Sistema da Pipeta de Deslocamento Positivo

As pipetas de deslocamento positivo funcionam como uma seringa. Não existe colchão de ar entre o pistão descartável e a amostra. Devido a ausência do colchão de ar para expandir ou contrair, a força de aspiração permanece constante durante toda a operação, não sendo afetada pelas propriedades físicas da amostra.

Este tipo de pipeta permite medir amostras com alta viscosidade e alta densidade como mercúrio e pasta de dente.



Av. Paulo Ferreira da Costa, 600
Lagoa Santa • MG • Brasil • CEP 33400-000
SAC - Serviço de Apoio ao Cliente
0800 031 34 11 • +55 (31) 3689-6900
Fax: +55 (31) 3689-6901
e-mail: sac@labtest.com.br
www.labtest.com.br

Bibliografia

1. Fabiana Barino, Márcio Biasoli; Curso Calibração de Instrumentos, Controlab;
2. Manual de Pipetas Eppendorf;
3. Manual de Pipetas Pipetman;
4. EN-ISO 8655-6:2002;
5. NP EN ISO/IEC 17025;
6. Info Qualidade - A Manutenção das pipetas é fundamental; Isabel Farias, dez 2009;
7. RDC 302:2005 - Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos;
8. Norma PALC.

Infotec - Informativo Técnico da Labtest

Tiragem: 1.000 exemplares - Distribuição gratuita

Equipe Labtest:

Presidente: Dra. Eliane Lustosa Cabral Gomez
Diretor de Inovação e Tecnologia: Dr. Márcio de Almeida Basques
Diretor Executivo: Tarcísio B. Vilhena Filho
Edição: Frida Wilke - Setembro/2010
Diagramação e Editoração: Agência FALA! Minas

LABTEST DIAGNÓSTICA S/A

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Lagoa Santa - Minas Gerais - Brasil. CEP 33400-000
Fone +55 (31) 3689-6900. SAC (DDG) 0800 031 34 11 - E-mail: sac@labtest.com.br - www.labtest.com.br

Visitando nossa página na internet seu laboratório dinamiza suas rotinas consultando:

- Manuais de automação de diversos equipamentos;
- POP's (Procedimentos Operacionais Padrão), Instruções de Uso, Fichas de Segurança (FISPQ) e Certificados de Análise dos produtos Labtest;
- Publicações Técnicas
- Notícias sobre o mercado.