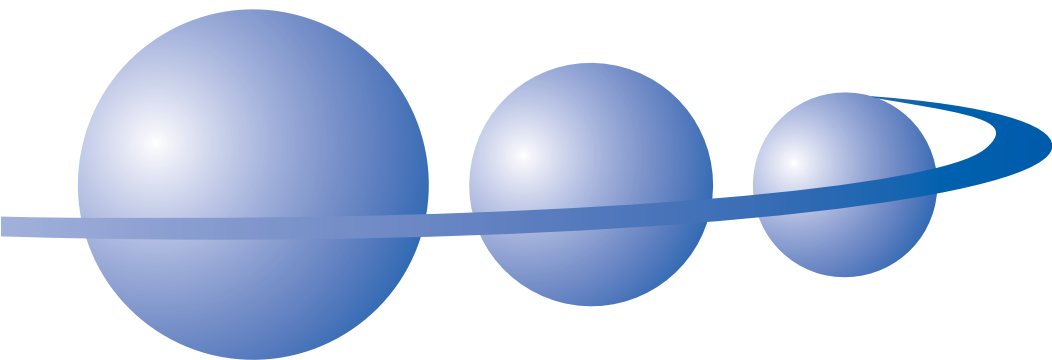


Boletim Técnico 28



AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE ESPECTROFOTÔMETRO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL



Josete Caetana Dani Sánchez
Juliana Braga Dallarosa
Agosto 2002



GOVERNO DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL

Olívio Dutra
Governador

Secretaria da Ciência e Tecnologia

Renato de Oliveira
Secretário



Odilon Antônio Marcuzzo do Canto
Presidente

Luiz Antônio Antoniazzi
Diretor Executivo

André Antunes de Azambuja
Superintendente de Produção

Dilton Bolzoni Pereira da Luz
Superintendente de Administração

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO
DE ESPECTROFOTÔMETRO
ULTRAVIOLETA E VISÍVEL**

Josete Caetana Dani Sánchez
Juliana Braga Dallarosa
Departamento de Química - DEQUIM
CIENTEC - PORTO ALEGRE, BRASIL

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Fundação de Ciência e Tecnologia - CIENTEC

Departamento de Informação e Documentação

Rua Washington Luiz, 675 - **CEP** 90010-460

Porto Alegre - RS.

tel (51) 3287.2000 - **Fax** (51) 3226.0207

e-mail: dinfor@cientec.rs.gov.br

homepage www.cientec.rs.gov.br

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Nelia Elsa Pooch

CRB-10/486

Sánchez, Josete Caetana Dani

Avaliação do desempenho de espectrofotômetro ultravioleta e visível / Josete Caetana Dani Sánchez e Juliana Braga Dallarosa. -- Porto Alegre : CIENTEC, 2002
26 p. - (Boletim Técnico ; 28)

1. Espectrofômetro - Avaliação de desempenho. I. Dallarosa, Juliana Braga. II. Fundação de Ciência e Tecnologia. III. Título. IV. Série.

CDU 503.422.3.07

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE ESPECTROFOTÔMETRO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

*JOSETE CAETANA DANI SÁNCHEZ
JULIANA BRAGA DALLAROSA*

FUNDAÇÃO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - CIENTEC

RESUMO

Na aplicação de métodos espectrofotométricos de análises, é de responsabilidade do analista verificar e validar o funcionamento apropriado desses instrumentos, visando a garantia de resultados confiáveis. Sendo o espectrofotômetro UV e V utilizado desde os laboratórios mais simples até os mais sofisticados, foi selecionada uma série de procedimentos que poderão ser utilizados pelos laboratoristas a fim de detectarem variações que possam comprometer a exatidão e precisão dos resultados analíticos. O presente trabalho abrange alguns parâmetros instrumentais essenciais para a garantia da aceitabilidade dos dados analíticos e que podem estimar a performance do equipamento.

Não pretende ser um estudo completo sobre o assunto, mas descreve alguns métodos práticos para a avaliação da exatidão da escala de absorvância em ampla faixa de comprimento de onda, abrangendo o UV e V; apresenta método de controle da qualidade da faixa espectral através dos pontos isobécticos de soluções indicadoras; descreve métodos para avaliar a presença de luz parasita ou dispersa através da utilização de filtros e soluções salinas adequadas; sugere metodologias que permitem avaliar a qualidade das cubetas utilizadas nas medidas da absorvância e transmitância de uma solução; aborda de maneira sucinta a linearidade fotométrica de um espectrofotômetro UV e V e cita algumas técnicas para a avaliação dessa.

São métodos de fácil manuseio, baixo custo e cujos reagentes estão disponíveis no mercado brasileiro.

ABSTRACT

When analytical spectrophotometric methods are employed, the operator expected to verify and validate the appropriate use of such equipment. Since UV and V spectrophotometers are employed from simple to sophisticated laboratories, a series of procedures are necessary in order to help technicians detect variations which may jeopardize accuracy and precision involved in such analytical results.

The present work covers some instrumental parameters essential to guarantee the acceptability of analytical data and, as a consequence, help predicting the equipment's performance. It is not intended to be taken as a reference article, but sheds some light into practical method description aimed, particularly, at the wide range wavelength absorbance scale accuracy, covering both UV and V spectral regions. It also presents a method for controlling the quality of the spectra range through indicating solution isosbestic points; describes methods to evaluate the presence of stray light by means of adequate filters and saline solutions; suggests methods that allows the proper evaluation of the quality of the cells employed for solution absorbance and transmittancy measurements, and, covers, resumably, the photometric linearity of an UV and V spectrophotometer as well as describes techniques for such evaluation.

The methods described are of easy handling, low cost and which reagents are available in the Brazilian market.

INTRODUÇÃO

O espectrofotômetro UV e V é um dos equipamentos de bancada ou de campo mais utilizado nos laboratórios de química ou análises clínicas, por ser de baixo custo, de fácil manuseio, de manutenção simples e por abranger uma vasta escala de determinações de cátions e ânions a baixo custo. Estes laboratórios são responsáveis pelo fornecimento de dados que influenciam as mais variadas decisões. A fim de garantir resultados confiáveis, uma das principais providências é monitorar o desempenho dos instrumentos, identificando sua necessidade de calibração.

Dos laboratórios de análises é exigida a rastreabilidade analítica, ou seja, após a emissão de resultados analíticos, que esses possam ser verificados em todos os aspectos como: quem realizou a análise, se houve manutenção do equipamento, a validação do método analítico, o controle de armazenamento e manipulação de padrões e amostras, a calibração do equipamento etc. (Leite, 1998).

Os testes de avaliação da performance têm, como objetivo principal, verificar a operação do equipamento em suas principais variáveis, que possam afetar o resultado analítico final. Os testes podem focar uma determinada parte do equipamento ou do método, ou podem analisar o comportamento geral da análise como um todo.

Segundo Ferreira (1998), "calibração é a comparação do valor numérico de uma grandeza (mensurando) com um valor de uma grandeza similar, de melhor qualidade (menor incerteza) tomada como padrão". É desejável que a verificação da performance dos equipamentos seja feita através do uso de materiais de referência certificados, cujas propriedades têm sido medidas com precisão por laboratórios de referência. Vários materiais de referência internacionais são atualmente acessíveis, como os do National Bureau of Standards - USA, U.S. Geological Survey - USA, Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques - França, Geological Survey of Japan, National Research Council - Canada, British Chemical Standard - Inglaterra, Community Bureau of Reference - Bélgica etc.

São inúmeros os pesquisadores que se dedicaram ao estudo de testes, de fácil utilização e acessíveis à maioria dos laboratórios de análise quantitativa, preocupados com a avaliação do desempenho dos espectrofotômetros UV e V (Rand, 1969; Dharan, 1980; Pedrazzi et al, 1980; Pedrazzi, 1995; Strufaldi, 1981; Linhares, 1995 e 1996; Frings et al, 1976, Hoxter, 1979).

O presente trabalho não pretende ser um estudo completo sobre os métodos disponíveis para o controle da qualidade em espectrofotômetros UV e V, mas uma pequena revisão bibliográfica sobre métodos rápidos e de fácil acesso. Pretende-se, numa abordagem sucinta, transmitir algumas técnicas de baixo custo e que poderão ser implantadas pelo laboratorista, a fim de verificar se o instrumento está apto a fornecer um resultado confiável.

I - AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DA ESCALA DE ABSORBÂNCIA

Algumas soluções, também chamadas de filtros líquidos ou padrões líquidos de absorvância, são indicadas para a estimativa da exatidão da escala de absorvância na região do ultravioleta e visível.

A ASTM E925-83 recomenda a utilização de soluções ácidas de dicromato de potássio (NBS/SRM 935) para a avaliação da performance da escala de absorvância na região do ultravioleta.

Preparo das soluções de dicromato de potássio (SRM 935).

Transferir $200,0 \pm 0,3\text{mg}$; $250,0 \pm 0,3\text{mg}$; $300,0 \pm 0,3\text{mg}$ e $350,0 \pm 0,3\text{mg}$ de dicromato de potássio p.a., $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (seco a 110°C por 1 noite) para balões volumétricos de 100 mL e diluir com água destilada. Diluir estas soluções, pipetando 20,0 mL de cada solução para balões volumétricos de 1L e adicionar 1 mL de ácido perclórico, HClO_4 1M (8,6 mL de HClO_4 70% diluídos a 100 mL com água destilada) e completar o volume com água destilada. Estas soluções conterão 40, 50, 60 e 70mg de dicromato de potássio por litro de solução, respectivamente. Preparar uma prova em branco, diluindo 1 mL de ácido perclórico 1M em balão volumétrico de 1L com água destilada. Estas soluções, adequadamente preparadas e estocadas, são estáveis pelo menos por seis meses. Ler cada solução num espectrofotômetro, em cubeta de 10 mm, nos comprimentos de onda indicados na Tabela I.

Determinar a absorvância de cada padrão líquido. Se os valores estiverem fora do intervalo aceitável, conforme a tabela I, repetir a leitura com uma baixa velocidade de varredura e uma largura da fenda menor. Se a absorvância lida em todos os comprimentos de onda estiverem fora da faixa de aceitabilidade, segundo a mesma tabela, preparar novas soluções e repetir o procedimento acima descrito. Persistindo os valores, um serviço qualificado de correção deve ser solicitado.

Tabela I

Calibração da absorbância na região do ultravioleta com utilização do padrão NBS/SRM 935

Comprimento de onda, nm	Largura da banda espectral, nm	Concentração da solução utilizada, mg/L	Faixa de absorbância aceitável
235	1,2	40	0,485 – 0,499
		50	0,607 – 0,625
		60	0,730 – 0,752
		70	0,853 – 0,879
257	0,8	40	0,564 – 0,582
		50	0,706 – 0,728
		60	0,840 – 0,875
		70	0,993 – 1,023
313	0,8	40	0,189 – 0,195
		50	0,237 – 0,245
		60	0,285 – 0,293
		70	0,332 – 0,342
345	0,8	20	0,207 – 0,216
		40	0,419 – 0,431
		50	0,523 – 0,539
		60	0,627 – 0,647
		70	0,733 – 0,765
350	0,8	20	0,210 – 0,217
		40	0,431 – 0,434
		50	0,528 – 0,543
		60	0,633 – 0,653
		70	0,740 – 0,768

Nota: Tabela extraída da ASTM E 925/83

Dharan (1980) citou diversas soluções que podem ser facilmente obtidas nos laboratórios e que servem para avaliar o desempenho da absorbância na faixa de 340nm a 700nm. Sugeriu a calibração da escala de absorbância através do uso de uma solução contendo 50mg de dicromato de potássio, $K_2Cr_2O_7$ p.a. (sal seco a $110^\circ C$, por uma noite) em 1000 mL de ácido sulfúrico, H_2SO_4 0,01N. Esta solução lida no comprimento de onda de 350nm, em cubeta de 10mm, deve apresentar um valor de absorbância de $0,535 \pm 0,002$, tendo como referência um branco de ácido sulfúrico 0,01N.

Dharan (op. cit.), sugeriu, outrossim, a utilização de uma solução de 40mg de cromato de potássio, K_2CrO_4 p.a. em 1000mL de hidróxido de potássio, KOH 0,05N, para a verificação da absorbância na região do ultravioleta e visível (tabela II).

Tabela II

Absorbância da solução de K_2CrO_4 (40mg/L) na região do ultravioleta e visível.

Comprimento de onda, nm	Absorbância
340	0,316
375	0,991
400	0,396
450	0,033

Segundo o mesmo autor, uma solução de sulfato de cobre, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ p.a., obtida pela dissolução de 20,00g do sal em 10mL de H_2SO_4 concentrado e levados a 1000mL com água destilada, deve apresentar as absorbâncias citadas na tabela III.

Tabela III

Absorbâncias da solução de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (20,00g/L) em comprimentos de onda (λ) na faixa de 400 a 700nm.

Comprimento de onda, nm	Absorbância
400	0,002
600	0,068
650	0,224
700	0,527

Tanto Dharan (1980) quanto Rand (1969) recomendaram a utilização de uma solução de sulfato de amônio e cobalto para a avaliação da escala de absorbância ou para verificar a linearidade fotométrica. A solução de sulfato de amônio e cobalto pode ser obtida a partir da dissolução de 14,481g de sulfato de amônio e cobalto, $CoSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ em 10mL de ácido sulfúrico concentrado e diluídos a 1000mL com água destilada. Esta solução deve apresentar as seguintes absorbâncias (Tabela IV):

Tabela IV

Absorbâncias em vários comprimentos de onda (λ), na região do visível, da solução de sulfato de amônio e cobalto (0,0367M).

Comprimento de onda, nm	Absorbância
400	0,012
450	0,077
500	0,163
510	0,174
550	0,077
600	0,014

A escala de absorbância, na região do visível (400 a 650nm), pode, também, ser testada pela utilização de três filtros do National Bureau of Standards - Série SRM 930, que possuem os valores de absorbância certificados para os comprimentos de onda de 440nm, 465nm, 590nm e 635nm (ASTM E925-83).

O procedimento para a avaliação da performance da escala de absorbância baseia-se na medida da absorbância de cada filtro, nos comprimentos de onda indicados, a fim de verificar a conformidade ou não dos valores obtidos no espectrofotômetro com os valores certificados.

Burke et al (1972) realizaram um estudo sobre os erros advindos das medições da absorbância de filtros líquidos, ou seja, padrões líquidos de absorbância. O estudo incluiu soluções obtidas a partir de compostos com alta pureza, misturas compostas e soluções aquosas de corantes orgânicos. Outrossim, descreveu a preparação e certificação do material de referência NBR SRM 931. Com referência a esse último, foram certificadas três faixas de absorbância (para um conjunto de três filtros e um branco de ácido perclórico 0,1N), cujos valores reproduzimos na Tabela V abaixo, com os respectivos comprimentos de onda. Burke et al (op. cit.) apresentaram os espectros de absorção dos referidos filtros líquidos e identificaram os picos a 302 e 512nm como devidos à absorção pelo NO_3^- e $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{+2}$, respectivamente e os picos a 395nm e o "plateau" a 650 - 700nm devidos à absorção do $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{+2}$.

Tabela V
Valores certificados de absorvância para os
filtros líquidos NBS SRM 931.

Filtro	Comprimento de onda, nm e largura da banda espectral, nm			
	302 (1,0)	395 (1,7)	512 (2,0)	678 (6,5)
"A" - branco	0,307 ± 0,003	0,304 ± 0,003	0,303 ± 0,003	0,115 ± 0,002
"B" - branco	0,608 ± 0,005	0,605 ± 0,005	0,606 ± 0,005	0,229 ± 0,003
"C" - branco	0,906 ± 0,007	0,907 ± 0,007	0,911 ± 0,007	0,345 ± 0,003

Nota: absorvância lida em cubeta de 10mm a 25°C.

Garfield (1992) sugeriu, para a avaliação da precisão e reprodutibilidade fotométrica, a utilização de uma solução de dicromato de potássio, $K_2Cr_2O_7$, $60 \pm 0,25$ mg/L em ácido sulfúrico 0,01 N, correndo três espectros nos comprimentos de onda citados na tabela VI abaixo. Citou um desvio máximo permitido de $\pm 1,0\%$.

Tabela VI
Absorvância da solução de $K_2Cr_2O_7$ ($60 \pm 0,25$ mg/L)
na região do UV.

Comprimento de onda, nm	Absorvância
235	0,747
257	0,869
313	0,293
350	0,644

Outrossim, Garfield (op. cit.) citou o filtro de vidro SRM 930 do National Institute of Standards and Technology para a avaliação do desempenho fotométrico de um espectrofotômetro.

II - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SELETOR DA ÁREA ESPECTRAL

O seletor espectral deve ser capaz de isolar a porção desejada do espectro. A qualidade deste depende não somente de seu modelo, mas também de sua faixa de emissão, que pode ser definida como a região espectral que é isolada eficientemente pelo seletor.

O seletor será mais eficiente quanto menor for sua faixa de emissão. Além da linearidade, a faixa de emissão é responsável pela resolução do aparelho, isto é, a capacidade de detectar variações na absorvância ou transmitância na escala de transmissão espectral.

O controle de qualidade do seletor espectral pode ser realizado através dos chamados "pontos isobésticos", nome derivado da palavra grega SBESSIS (iso= mesmo e béstis= absorção). Segundo a American Society of Testing Materials, o termo isobéstico indica o comprimento de onda no qual são iguais as absorvâncias de uma substância quando em diferentes valores de pH. Na literatura referente a este assunto, usa-se indistintamente o termo isobéstico ou isobéstico.

A determinação do ponto isobéstico permite verificar se há concordância entre a emissão da energia radiante pelo seletor e o valor do comprimento de onda indicado pelo dial do seletor da área espectral. Este controle deve ser feito periodicamente pelo analista.

A discordância permitida, para o uso rotineiro, será proporcional à capacidade de seleção do comprimento de onda do equipamento. O método segue um princípio básico e simples, no qual são usadas substâncias facilmente disponíveis, sem requisitos especiais de pureza, concentração, umidade ou controle da temperatura (Hoxter, 1979). A concentração absoluta da solução não influi no deslocamento do comprimento de onda do ponto isobéstico. Nestes comprimentos de onda, as absorções independem do pH dentro de certos limites. Se colocarmos uma solução indicadora não tamponada em duas cubetas e acidificarmos uma e alcalinizarmos a outra, com igual quantidade de ácido e base de mesma concentração, as leituras das absorvâncias serão idênticas no ponto isobéstico. Assim, lidas as diferenças entre as absorvâncias (ou transmitâncias) destas soluções a diferentes comprimentos de onda, somente será zero num comprimento de onda, ou seja, no ponto isobéstico.

Hoxter (1979), realizou o citado teste com uma solução indicadora de azul de bromotimol (40 mmol/L), a diferentes pH, a 20°C e encontrou pontos isobésticos a 260nm, 279nm, 325nm e 498nm.

Numa avaliação do desempenho de um seletor espectral, pode-se selecionar, na Tabela VII, a solução indicadora que contemple a faixa de comprimento de onda utilizada em análises de rotina e prepará-la de acordo com a concentração citada (Hoxter, op. cit.). Utilizando cubetas sem imperfeições, ou seja, cubetas já testadas, para uma mesma solução, nos diferentes comprimentos de onda (Tabela VII), o valor da absorbância não deverá sofrer alteração.

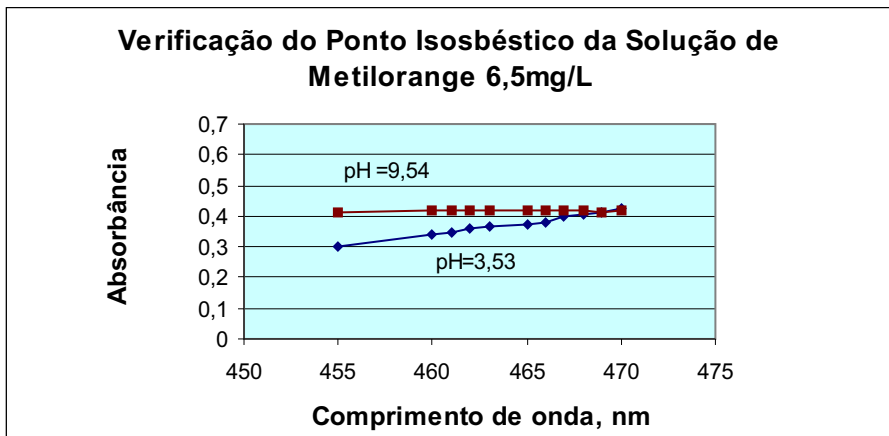
Tabela VII

Comprimentos de onda isobésticos e concentrações de soluções indicadoras (Hoxter, 1979).

Substância	Comprimento de onda, nm					Concentração, mg/L
	201-270	271-290	291-325	326-400	401-550	
Riboflavina	266	275	296	369	462	9,5
Vermelho de fenol	238	273	322	365	514	7,0
Dicromato de potássio	245	-	297	339	445	29,5
Azul de bromotimol	260	279	325	-	498	25,0
Verde de bromocresol	265	277	-	329	508	35,0
Púrpura de bromocresol	-	-	322	-	490	27,0
Metilorange	-	-	-	352	465	6,5
Vermelho do congo	269	-	295	-	541	14,0

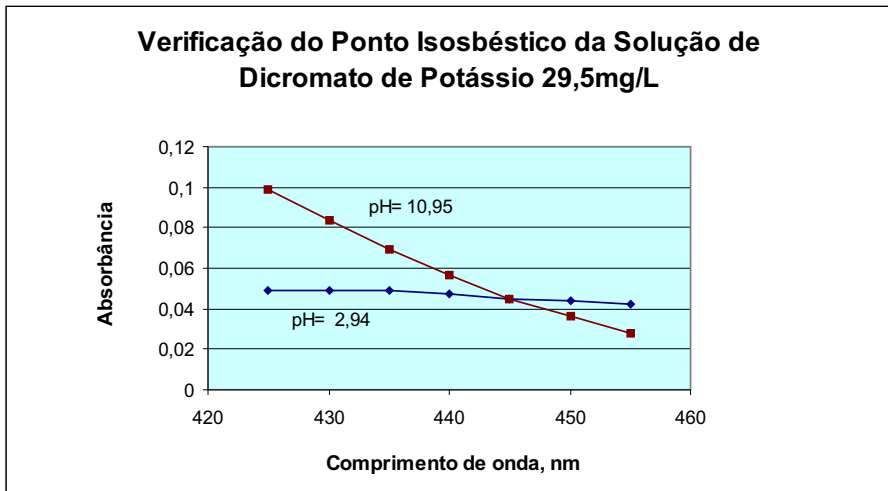
Parthasarathy et al (1958) também utilizaram soluções indicadoras ácidas e básicas para estimar a performance do comprimento de onda de espectrofotômetros. Encontraram o valor de 469nm para o ponto isobéstico do metilorange e Hoxter (1979), segundo Tabela VII, 465nm. O Laboratório de Águas da Fundação de Ciência e Tecnologia CIENTEC confirmou o valor (469nm) encontrado por Parthasarathy et al. (gráfico I).

Gráfico I



Para a solução de dicromato de potássio (Tabela VII), Pedrazzi et al (1980) encontraram um ponto isobéptico a 442nm e Hoxter (op. cit.) a 445nm. O valor encontrado no presente estudo foi de 445nm (gráfico II).

Gráfico II



Garfield (1992) recomendou a utilização de filtro de Holmium e Didymium, na região do UV e V, para verificar a precisão e reprodutibilidade do comprimento de onda, admitindo um desvio de $\pm 1,0$ nm e sugerindo que a avaliação seja realizada duas vezes ao mês.

III - AVALIAÇÃO DO DESVIO DA ENERGIA RADIANTE OU LUZ PARASITA

Um grande problema relacionado com a fonte de energia é a chamada luz parasita ou dispersa, que vem a ser qualquer tipo de energia luminosa que incide na amostra com comprimento de onda diferente do indicado na escala do monocromador. Segundo Dharan (1980), a luz dispersa num determinado comprimento de onda analítico deverá ser inferior a 0,1%. As principais causas da formação da luz parasita são defeitos no sistema ótico, deposição de fumos químicos no vidro da lâmpada e até nos orifícios do aparelho e reflexões sobre as superfícies de diferentes partes do instrumento. Esta luz pode causar erros analíticos, inclusive afetando a linearidade da curva de calibração ou diminuindo a absorbância.

Para uma avaliação da luz dispersa (parasita) em 340nm, Dharan (1980) sugeriu a utilização do filtro Corning nº 3060, cuja percentagem de transmitância deve ser zero, pois este permite apenas a passagem da luz visível, cortando todos os fótons abaixo de 340nm. A percentagem de transmitância registrada será igual à quantidade de luz dispersa. Para a luz dispersa a 400nm pode ser utilizado o filtro Corning nº 3389 (Tabela VIII).

Rand (1969) citou o filtro Corning Vycor 7910 para a medida do desvio da energia radiante, e Poulson (1964) listou uma série de materiais e filtros que podem ser utilizados para a mesma finalidade (Tabela VIII).

Tabela VIII

Materiais utilizados na avaliação da luz dispersa (parasita).

λ , nm	Material
205	Filtro Corning nº 7910(espessura 3,3±0,3mm)
200	Célula de 1cm – 12g/L de KCl em H ₂ O
224	Célula de 1cm – 10g/L de NaBr em H ₂ O
260	Célula de 1cm – 10g/L de NaI em H ₂ O
340	Filtro Corning nº 3060
400	Filtro Corning nº 3389

A fração desviada da energia radiante também pode ser medida através de soluções salinas citadas na ASTM E925-83 (Tabela IX).

Tabela IX

Soluções utilizadas na avaliação da fração da energia radiante desviada (ASTM E925-83).

Solução	λ , nm
KI, 1,0 g/L em H ₂ O	220
K ₂ Cr ₂ O ₇ , 0,25g/L em KOH 0,05N	370

Na utilização destas soluções (Tabela IX), usar lâmpadas com fonte de luz visível em 370nm e com fonte de luz adequada a 220nm. Determinar a transmitância ou absorbância de cada solução no comprimento de onda citado, usando como referência (branco) o solvente adequado. Nos comprimentos de onda indicados, as soluções são opacas e as suas transmitâncias são proporcionais ou equivalentes à fração desviada de energia radiante.

Outro procedimento que pode ser utilizado para a mesma finalidade é o uso de solução de sulfato de níquel, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, p.a., a 5%. Lê-se as absorvâncias correspondentes aos comprimentos de onda de 400, 510 e 700nm utilizando-se uma prova em branco com água destilada. As leituras em 400nm e 700nm correspondem aos pontos de maior absorvância, e uma diminuição de 3% ou mais na absorvância medida em relação à absorvância inicial (valor obtido por ocasião do início do uso do equipamento) indica a presença de problemas. O menor valor de absorvância corresponde a 510nm. Um aumento de 3% nesta, em relação à leitura inicial, indica um aumento da faixa de emissão, possivelmente devido à interferência junto à fonte de energia radiante, como luz estranha ao sistema óptico.

Pedrazzi et al (1980) recomendaram a utilização de uma solução ácida de sulfato de níquel, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40%. Dissolver 40g do citado sal em 75 mL de água destilada contendo 1mL de ácido clorídrico concentrado e diluir a 100 mL com água destilada. Filtrar se necessário e ler a absorvância desta solução a 400 e 700 nm, contra uma prova em branco contendo ácido clorídrico 1% (v/v). A luz parasita será constatada se variações de $\pm 3\%$ forem detectadas em relação às absorvâncias inicialmente obtidas (quando do uso inicial do espectrofotômetro).

Strufaldi (1981) recomendou a utilização desta solução como padrão para determinar a presença de energia parasita, a qual é estável por vários anos se armazenada em local fresco e ao abrigo da luz. Recomendou filtrar as soluções-padrão e o branco em papel de filtração lenta, desprezando os primeiros 5mL. Transferir para cubetas testadas, tampar e parafinar a junção cubeta-tampa para selar definitivamente o sistema. Recomendou ajustar o zero do equipamento com a prova em branco, a 400nm e então ler a solução-padrão nos comprimentos de onda: 460nm, 510nm, 550nm e 700nm. Segundo Strufaldi (op. cit.), o espectrofotômetro que apresentar variações nas absorvâncias de $\pm 3\%$ em relação às absorvâncias iniciais deverá ser revisado por técnico especializado.

Os desvios de energia encontrados dependem das características espectrais e são fixados limites nas especificações dos aparelhos. Porém, se excessivo desvio for verificado, deve-se procurar auxílio técnico.

Geralmente, problemas relacionados com o desvio da energia radiante surgem devido às precárias condições ambientais, como poeira, corrosão do colimador ou dispersor etc.

IV - CALIBRAÇÃO DE CUBETAS

As cubetas, recipientes de vidro ou quartzo que são utilizados como suportes de soluções por serem a porção mais negligenciada do aparelho, contribuem significativamente para aumentar o erro na leitura de uma absorvância ou transmitância. Para realizar-se um trabalho preciso é fundamental certificar-se de sua qualidade, tendo em vista que serve de recipiente para a amostra, não devendo, portanto, contribuir ou interferir nas medidas de absorvância ou transmitância.

As cubetas, em função do uso contínuo, podem perder a transparência, podem adquirir coloração e sofrerem danos por abrasão, como ranhuras. Cubetas adquiridas em épocas diferentes ou de diferentes fabricantes, podem apresentar alterações nas leituras da transmitância ou absorvância de uma solução. Existem cubetas de diversas formas geométricas, como redonda, quadrada, retangular e de diferentes caminhos ópticos. As cubetas redondas não são exatamente redondas e não são opticamente polidas, apresentando irregularidades e efeitos ópticos. As cubetas quadradas ou retangulares apresentam faces planas e paralelas, são opticamente polidas, isentas de efeitos ópticos, sendo, portanto, mais precisas e exatas.

O controle de qualidade das cubetas compreende testes de superfície e determinação de erros na espessura, assim como testes para verificar a limpeza da cubeta.

Para o controle das imperfeições na parede das cubetas, Pedrazzi et al (1980) sugeriram um teste simples, realizado com água destilada. Encher todas as cubetas com água destilada e escolher uma cubeta, ao acaso, que será considerada como "referência". Ler no espectrofotômetro (em feixe simples) o valor da absorvância e anotar. Fazer leituras com as outras cubetas, nas mesmas condições, nos seguintes comprimentos de onda: 420, 570, 580 e 650nm. Realizar as medidas em triplicata, fazendo a média dos valores obtidos e comparar os desvios em relação ao da absorvância encontrada para a referência. Todas as cubetas deverão ser lidas nos mesmos comprimentos de onda.

Testes para a determinação de imperfeições na espessura das cubetas podem ser realizados utilizando o procedimento acima referido para o teste da superfície da cubeta, substituindo a água destilada por uma solução aquosa de sulfato de cobre 5% e determinando sua absorvância a 610nm. Pedrazzi et al (1980) recomendaram o mesmo teste com solução de sulfato de cobre a 9%.

Diante dos valores obtidos nos testes, as cubetas que apresentarem variações de absorvância de $\pm 0,002$ em relação à cubeta "referência", em espectrofotômetro, apresentam imperfeições, não devendo ser utilizadas em trabalhos analíticos. Para fotômetros de filtro, a variação máxima aceitável é de $\pm 0,01$.

A causa mais comum de erro deve-se a depósitos sobre as paredes da cubeta, causada por sua ineficiente limpeza. A ASTM 275/93 cita um método para testar a limpeza e diferenças na espessura ou paralelismo das paredes da cubeta, determinando sua absorvância e utilizando o ar como referência. Determinar a absorvância de uma cubeta com água, usando ar como referência, a 240nm (com cubeta de quartzo) ou a 650nm (com cubeta de vidro). Em equipamentos com registrador, varrer a região espectral de interesse. A absorvância obtida não deve ser maior do que 0,093 para células de 1cm de quartzo e 0,035 para células de 1cm de vidro.

Para verificar se todas as paredes da cubeta são iguais, ler a absorvância trocando a posição dessa. A diferença de absorvância obtida não deve ser superior a 0,005.

A correção das cubetas também pode ser feita lendo a absorvância da cubeta-amostra com solvente utilizado na metodologia analítica e usando o mesmo solvente na cubeta-referência. A diferença não deve ser maior do que 0,01. Para a correção da imperfeição, o valor obtido para a absorvância da cubeta-amostra deverá ser subtraído de todas as leituras de absorvância, para as amostras que utilizaram o mesmo solvente do teste, se medidas nas mesmas cubetas em que o teste foi realizado (ASTM 275/93).

V - LINEARIDADE FOTOMÉTRICA

A linearidade é a capacidade do instrumento de registrar um sinal proporcional à intensidade da luz. A linearidade fotométrica é uma maneira eficaz de caracterizar o desempenho espectrofotométrico de um equipamento. Os dados fotométricos obtidos pelo analista serão usados para determinar a concentração de íons em uma solução. Necessário faz-se estabelecer a faixa de linearidade da relação absorvância : concentração.

Rand (1969) apresentou diversos métodos para a avaliação da linearidade, sensibilidade, calibração dos comprimentos de onda, luz parasita e exatidão para espectrofotômetros e colorímetros, com a utilização de padrões. Nenhum dado fotométrico deve ser considerado correto se o equipamento não foi testado com padrões. Rand realizou alguns testes provando que o grau de não-linearidade de uma curva absorvância versus concentração é função do equipamento, da largura da banda de absorção e da largura da banda espectral. Com a largura da banda, a linearidade tende a diminuir. Assim, se a declividade ótima de uma curva de calibração absorvância versus concentração é igual a 1, em bandas com larguras maiores a declividade será menor do que 1. A declividade de curva varia de instrumento para instrumento e de composto para composto, pelas mesmas razões que varia a linearidade fotométrica (Rand, 1969).

A resposta linear obtida em espectrofotômetro depende de um bom relacionamento entre a energia luminosa, o receptor de fótons e a escala de leitura. Com o passar do tempo, a célula fotoelétrica ou fototubo pode perder sua capacidade original de transformação de fótons em elétrons, resultando numa modificação da linearidade das curvas de referência.

Para avaliar-se a linearidade fotométrica, deve-se determinar a faixa sobre a qual a fotometria é linear para a análise de um dado parâmetro e preparar uma curva de trabalho.

Para cada parâmetro a ser determinado por um método analítico, preparar pelo menos três soluções contendo o componente em concentrações que cubram a faixa para a qual o método é destinado. Medir a absorvância de cada solução no comprimento de onda analítico.

Plotar os dados de absorvância na ordenada e suas respectivas concentrações na abscissa. Levantar uma reta, que representará a linearidade da relação absorvância : concentração dos pontos experimentais.

Strufaldi (1981) apresentou em detalhes como preparar uma curva de calibração/ trabalho e possíveis causas de erro, ou seja, erros originados pela amostra e erros laboratoriais, assim como sistemas de controle para a avaliação da qualidade total de um laboratório.

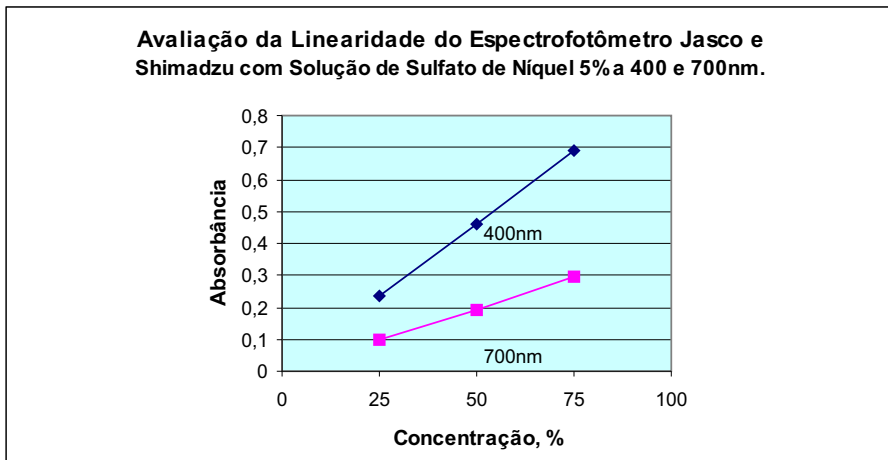
Dharan (1980) citou um teste simples, ao alcance de muitos laboratoristas, para verificar a linearidade de espectrofotômetros. Usando os mesmos reagentes por ele citados para a avaliação da absorvância (item.I), mas utilizando a metade, a mesma quantidade e o dobro da substância empregada no teste da absorvância, observou que a absorvância dessas três soluções devem obedecer à relação 1:2:4.

Rand (1969) sugeriu a utilização de vários compostos para testar a linearidade fotométrica, entre eles, a utilização de soluções obtidas a partir da dissolução de 2, 4, 6, 8 e 10g de sulfato de cobalto e amônio (alta pureza) em 100mL de ácido sulfúrico 1%(v/v). Estas soluções fornecerão valores de absorvância de aproximadamente 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 e 1,23 em 512nm.

O controle da linearidade pode ser feito a partir de uma solução aquosa de sulfato de níquel 5%. A partir desta, preparar diluições de 75%, 50% e 25%, que devem ser lidas nos comprimentos de onda de 400nm e 700nm. Registrando os resultados em papel milimetrado, traçar a melhor reta entre os pontos. Se houver pontos que se afastam da reta, determinando uma curvatura ou a formação de "plateau", é sinal da perda da linearidade e de que o espectrofotômetro necessita uma revisão realizada por técnico especializado.

Abaixo apresentamos o gráfico III de linearidade obtido em dois espectrofotômetros (Jasco e Shimadzu) no Laboratório de Águas da CIENTEC.

GRÁFICO III



Para avaliar a faixa de linearidade de uma curva de trabalho, tem-se que determinar a precisão dos dados fotométricos. A precisão fotométrica é a capacidade do sistema fotométrico de reproduzir o mesmo valor em sucessivas determinações (ASTM 275/93). Na prática, a precisão é representada pelo desvio-padrão. Tanto a precisão como a exatidão fotométrica podem ser determinadas com a utilização de padrões de referência que possuem a transmitância ou absorvância conhecidas.

Como curiosidade, apresentamos abaixo a Tabela X extraída da ASTM 275/93, com a referência de telas metálicas (ou filtros de vidro) que podem ser adaptados em espectrofotômetros (feixe simples), e obtidas dez leituras sucessivas de absorvância ou transmitância aparente, com as quais determina-se o desvio-padrão, avaliando-se a precisão fotométrica.

Tabela X

Telas perfuradas utilizadas para as medidas da repetibilidade fotométrica

Identificação, Nº	Transmitância nominal	Absorvância nominal
20W	0,01	2,0
30T	0,035	1,5
10S	0,07	1,2
12 1/2P	0,145	0,84
10N	0,205	0,70
15L	0,29	0,54
15H	0,41	0,39
20G	0,50	0,30
40Spec	0,60	0,21

Pedrazzi et al (1980) e Frings et al (1976) citaram um teste para o controle da linearidade que utiliza o corante para alimentos "French's green", que possui absorção máxima em três comprimentos de onda: 257nm, 410nm e 630nm e não depende da temperatura no intervalo de 4° a 56°C. Outrossim, não foram detectadas variações da absorvância no intervalo de pH de 2,5 a 10,0. A partir de uma solução-estoque do corante (Frings et al, op. cit.), faz-se diluições a 100%, 50%, 25% e 12,5% com água destilada. Faz-se a leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda citados, com cubetas de 10mm e traça-se a curva de calibração em papel milimetrado.

O indicador (corante) "French's green" citado por Frings et al (op. cit.) é constituído de uma mistura de 5 partes do FDC Yellow Nº 5 com 1 parte do FDC Blue Nº 1, 25g/L em água e propileno glicol.

A solução estoque (0,5mL/L) é obtida diluindo 0,10mL do indicador French's green a 200mL com água destilada. Esta solução é estável por 6 meses, se estocada em recipiente escuro, a temperatura ambiente.

Rand (1969) citou uma solução de nitrato de potássio 1,170% como solução-padrão para a avaliação da exatidão fotométrica na região do ultravioleta, citando o valor da absorvidade encontrado, em 302nm, com cubetas de 10 mm, como 0,0705 - 0,0703. A absorbância de uma solução depende da absorvidade, do caminho óptico (largura da cubeta) e da concentração da solução. A absorbância = $a \times c$, onde a = absorvidade e c = concentração da solução. O valor da absorbância encontrado por Rand (op. cit.) foi de 0,825.

VI - CONCLUSÃO

Não recomendamos uma metodologia em especial para a avaliação da performance do equipamento, pois esta dependerá da disponibilidade dos reagentes no laboratório, assim como da faixa de comprimento de onda desejada. Dependendo da bibliografia consultada, o erro máximo admissível na avaliação da precisão e reprodutibilidade fotométrica varia de 1 a 3% da absorbância obtida. Recomendamos, para as soluções em que não é citado o desvio aceitável de absorbância, um desvio máximo de $\pm 1\%$, seguindo a sugestão de Garfield (1992). Dependendo da frequência de utilização do espectrofotômetro, recomendamos uma verificação mensal. Se o equipamento apresentar boa performance após alguns meses, o período de verificação poderá ser estendido, a critério do usuário. Outrossim, sugerimos uma verificação semestral para as cubetas. Os testes descritos são, em sua maioria, de baixo custo, rápidos, eficientes e cujos reagentes estão disponíveis no mercado. São procedimentos que deverão integrar o sistema de qualidade, fazendo parte da rotina de um laboratório analítico, dando condições aos laboratoristas de identificarem a necessidade de calibração dos espectrofotômetros, isto é, de solicitarem um serviço especializado de manutenção.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTM. E275-93 : Standard practice for describing and measuring performance of ultraviolet, visible, and near-infrared spectrophotometers. In: ___. **1998 annual book of ASTM standards**. West Conshohocken, PA, 1998. v.03.06, p.682-691.

ASTM. E925-83 (Reapproved 1994) : Standard practice for the periodic calibration of narrow band-pass spectrophotometers. In: ___. **1998 annual book of ASTM standards**. West Conshohocken, PA, 1998. v.03.06, p.763-768.

BURKE, R.W.; DEARDORFF, E.R.; MENIS, O. Liquid absorbance standards. **Journal of Research of the National Bureau of Standards A** : Physics and Chemistry. v.76A, n.5, Sept.-Oct.1972, p.469-482.

DHARAN, M. **Control de calidad en los laboratorios clínicos**. Barcelona : Reverté, c1980.

FERREIRA, V.C.S. **Avaliação da incerteza nas medições segundo a ISO-GUM**. Porto Alegre : Rede Metrológica RS, 1998. 57p.

FRINGS,C.S.; MUSCAT, V.I.; WALDROP, N.T. Convenient method for checking detector response of spectrophotometers at three wavelengths. **Clinical Chemistry**, v.22, n.1, p.101-102, 1976.

GARFIELD, Frederick M. Instrument Performance Checks. In: ___. **Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories**. Arlington, VA : AOAC International, 1992, c1991. Appendix C. p.156

HOXTER, G. Suggested isosbestic wavelength calibration in clinical analyses. **Clinical Chemistry**, v.25, n.1, p.143146, 1979.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 3.ed. São Paulo : Átomo, 1998. 224p.

LINHARES, P.S. Qualidade total no laboratório de análise/ensaio. **TECBAHIA**, Camaçari, v.10, n.2, maio/ago., 1995.

LINHARES, P.S. Qualidade total no laboratório de análises geoquímicas. **Geochim. Brasil**, v.10, n.2, p.257-262, 1996.

PARTHASARATHY, N.V.; SANGHI, I. A simple technique for the calibration of the wave-length scale of spectrophotometers. **Nature**, v.182, n.1, p.44, 1958.

PEDRAZZI, A.H.P. Controle de qualidade de aparelhos espectrofotométricos. **NewsLab**, v.2, n.8, p.40-47, 1995.

PEDRAZZI, A.H.P.; VILELA, S. Calibração e controle de qualidade em fotômetros e espectrofotômetros de diferentes procedências. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, v.12, n.1-4, p.21-27, jan./dez. 1980.

POULSON, R.E. Test methods in spectrophotometry : stray-light determination. **Appl. Opt.**, v.3, p.99, 1964.

RAND, R.N. Practical spectrophotometric standards. **Clinical Chemistry**, v.15, n.9, p.839-863, 1969.

STRUFALDI, B. **Obtenção de amostras; espectrofotometria; controle de qualidade.** Mcwill : São Paulo, 1981. P.50-133.

Relação dos Boletins Técnicos já publicados

- 01 - Influência do comprimento da base de medida do extensômetro na determinação do módulo de elasticidade de concreto. (Esgotado)
- 02 - Análise tensométrica, mecânica e química de esticadores e ganchos e aço-carbono fundido, para tensores metálicos. (Esgotado).
- 03 - Considerações sobre inibição da pega de concreto em regiões em contato com fôrmas de chapas de madeira compensada.
- 04 - Estudos de impacto ambiental.
- 05 - Arroz parboilizado: método para determinação de grãos não-gelatinizados.
- 06 - Cromo em gelatina.
- 07 - Avaliação da emissão de fluoretos totais em plantas de fertilizantes.
- 08 - Determinação de quartzo em poeira respirável.
- 09 - Dias climáticos típicos para o projeto térmico de edificações em Porto Alegre.
- 10 - Determinação de mercúrio em pescado por espectrofotometria de absorção atômica - Técnica do vapor frio.
- 11 - Dosagem empírica de concreto.
- 12 - Determinação de resíduos de triadimenol por cromatografia gasosa.
- 13 - Método de seleção de áreas para aterros sanitários.
- 14 - Determinação de fluoreto em carvão com utilização de eletrodo íon-seletivo.
- 15 - Grãos não-gelatinizados em arroz parboilizado, avaliação de métodos.
- 16 - Os institutos de pesquisa tecnológica estaduais na apropriação da política nacional de C & T. O caso CIENTEC/RS. Uma síntese dos dados e primeiras reflexões.
- 17 - Parboilização do arroz: parâmetro de encharcamento.
- 18 - O papel do estado no processo de desenvolvimento científico e tecnológico.
- 19 - Cor na parboilização do arroz.
- 20 - Utilização do carvão e meio ambiente.
- 21 - Avaliação de metodologias para determinação de gorduras em produtos formulados.
- 22 - Sistemas de monitoramento ambiental: conceitos básicos e proposta para o geossistema.
- 23 - Metodologia para dimensionamento de pilares em minas de carvão do sul do Brasil.
- 24 - Determinação de gorduras em rações: comparação de metodologias.
- 25 - Fissuras em Alvenarias: causas principais, medidas preventivas e técnica de recuperação.
- 26 - Hidrodinâmica e transferência de massa em coluna de extração do tipo Karr.
- 27 - Questão Ambiental e Incubação Tecnológica.
- 28 - Avaliação do Desempenho de Espectrofotômetro Ultravioleta e Visível.



*Tecnologia e inovação
na vanguarda do
desenvolvimento*

Missão da CIENTEC

***Promover o desenvolvimento da sociedade
através de ações em tecnologia industrial básica,
pesquisa e inovação tecnológicas.***



CIENTEC
FUNDAÇÃO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Rua Washington Luiz, 675
CEP 90010-460 - Porto Alegre RS Brasil
tel (51) 3287.2000 fax (51) 3226-0207
e-mail cientec@cientec.rs.gov.br
homepage www.cientec.rs.gov.br