

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



**MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO EM ESPECTROFOTOMETRIA**

Departamento de Biomateriais e Biologia Oral

Odontologia - USP

2019

Organizadores: Paulo Eduardo Capel Cardoso e Joyce de Almeida Martins

AUTORES: Giovana Improta Andretta, Júlia Buosi Alves, Yolanda de Toledo Salvado da Ressurreição

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

C268m Cardoso, Paulo Eduardo Capel.

Manual de procedimento operacional padrão em espectrofotometria / [Org.] Paulo Eduardo Capel Cardoso, Joyce de Almeida Martins. [Aut.] Giovana Improta Andretta, Júlia Buosi Alves, Yolanda de Toledo Salgado da Ressurreição. – São Paulo : Departamento de Biomateriais e Biologia Oral / FOU SP, 2019.

57p.

ISBN 978-85-7040-037-6

1. Manuais. 2. Espectrofotometria. 3. Equipamentos de laboratório.
I. Cardoso, Paulo Eduardo Capel. II. Martins, Joyce de Almeida. III.
Título

CDD 617.695

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**MANUAL DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO EM ESPECTROFOTOMETRIA**

DEPARTAMENTO DE BIOMATERIAIS E BIOLOGIA ORAL

Organizadores: Paulo Eduardo Capel Cardoso e Joyce de Almeida Martins

AUTORES: Giovana Improta Andretta, Júlia Buosi Alves, Yolanda de Toledo Salvado da Ressurreição

Odontologia - USP

2019

Apresentação

Sempre acreditei no grande potencial dos Alunos de graduação e este Manual é mais uma prova cristalina de que os graduandos também podem gerar ciência de qualidade, alicerçando, ainda mais, o conhecimento construído passando-o adiante.

A maior parte deste conhecimento nasce nos laboratórios de pesquisa da instituição, e aqui se impõe o primeiro desafio ao aluno de Iniciação Científica (IC): conhecer e manejar de forma criteriosa e cuidadosa cada um dos equipamentos de sua pesquisa, sendo, muitos deles, complexos.

Mas como fazer com que o Aluno de IC transponha este primeiro desafio de forma eficiente e, principalmente, perene?

A constante repetição dos ensaios laboratoriais durante a operação do equipamento pode ser uma solução para este desafio, mas o resultado é temporário, e como uma "decoreba" às vésperas de uma prova importante, as informações são usadas no curto prazo e logo esquecidas. Mais do que "decorar" sobre o funcionamento de um equipamento, é necessário "aprender" sobre ele. É preciso formar jovens pesquisadores que aprendam sobre os equipamentos usados em suas pesquisas e não apenas pessoas que os operem como autômatos.

Já é lugar comum de que, quanto mais se ensina, mais se aprende, e esta é uma das certezas que levo na minha carreira de Docente na Faculdade de Odontologia da USP por mais de 30 anos. Com isto em mente, propus a quatro alunas de IC a criação de um texto, descrevendo o passo a passo detalhado para "ensinar" aos leitores o como operar um dos espectrofotômetros de via líquida do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral. Algum tempo depois o texto tomou forma e, como sempre é possível melhorar, foi além de uma simples "receita de bolo", contendo explicações de como o equipamento funciona.

Além do espectrofotômetro propriamente dito, o presente *Manual* também descreve a utilização e o funcionamento de outros equipamentos "satélites" e complementares às análises espectrofotométricas, como pipetas, balança analítica e pHmetros – dispositivos estes também necessários para alcançar a alta precisão nos resultados, imprescindíveis neste tipo de análise química.

Assim nasceu o que denominamos aqui de *Manual de procedimento operacional padrão em espectroscopia*. Fartamente ilustrado, foi além e se materializou como um texto de referência destinado a Alunos e Professores que desejam iniciar suas pesquisas no campo da espectrofotometria de via líquida.

Assim, este texto é resultado de um trabalho coletivo de produção intelectual e edição, encabeçado por quatro Alunas de IC e orientado por um Professor da FOU SP.

Concluindo, este não é um documento definitivo e estático, que se encerra em si, mas um texto aberto que aceita colaborações e, assim como a ciência, um instrumento dinâmico.

Assim, convidamos você a utilizá-lo e, com suas sugestões, melhorá-lo.
Aproveite!

Paulo Eduardo Capel Cardoso, Professor do Departamento de Biomateriais da FOU SP.

Prefácio

Prefácio das Alunas de Iniciação Científica que elaboraram este Manual

Ao iniciarmos os ensaios laboratoriais da nossa primeira pesquisa como alunas de iniciação científica, deparamo-nos com vários equipamentos de operação muito complexa, mas cuja correta utilização seria essencial. Dessa forma, depois de usarmos os diferentes equipamentos e aprender como funcionavam e deveriam ser cuidados, fomos convidadas pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Capel Cardoso a desenvolver um material que auxiliasse futuros usuários, como alunos de graduação, pós-graduação e até mesmo docentes.

O propósito deste Manual de Procedimento Operacional Padrão para Espectrofotometria é facilitar o aprendizado e a rotina para o uso de alguns equipamentos do Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, tendo como foco principal a espectrofotometria, um método que analisa a interação da luz com substâncias em meio líquido.

Nesse processo, a principal interação analisada é a absorbância, uma vez que o motivo da criação deste material originou-se em um determinado contexto de pesquisa odontológica.

Neste manual, o leitor encontrará instruções de como usar diferentes equipamentos necessários para preparar e avaliar amostras em meio líquido, sendo eles: a balança de precisão, o agitador magnético, o pHmetro, a pipeta e, por fim, o espectrofotômetro de via líquida.

Os equipamentos foram organizados no presente texto seguindo a sua ordem de utilização, com linguagem simples e objetiva, de modo a auxiliar a compreensão do leitor na medida em que sentir necessidade de maior clareza na execução dos procedimentos.

Além disso, também foram estabelecidas normas de conduta no laboratório. A organização das bancadas, a limpeza das vidrarias e a importância da correta manipulação dos aparelhos são ressaltadas em todos os itens, pois são fundamentais para o sucesso de um experimento visando o melhor aproveitamento e manutenção.

Esperamos que esse material possa contribuir para o desenvolvimento científico em pesquisas odontológicas realizadas neste laboratório, visando honrar o histórico e a posição de destaque que ocupa a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Portanto, convidamos o leitor a desfrutar e usufruir deste conteúdo.

Boa leitura!

Giovana, Joyce, Júlia e Yolanda.

Agradecimentos

Agradecemos às pessoas que foram fundamentais desde o princípio para que pudéssemos construir este material, entre elas, o **Prof. Dr. Fernando Nogueira**, pela apresentação do laboratório e auxílio no uso dos equipamentos, e o **Prof. Dr. Rafael Yagüe Ballester**, pela contribuição nos ensinamentos com suas aulas de Word avançado.

Além disso, nossa gratidão ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Silva Costa Teixeira** (Politécnica USP), pelo embasamento teórico em espectrofotometria, e aos técnicos do laboratório, **Douglas Nesadal de Souza** e **Antônio Carlos Lascala**, pela paciência e disposição em nos ensinar o manejo dos equipamentos do laboratório.

Gostaríamos, ainda, de reconhecer a contribuição de pessoas que se voluntariaram a testar a funcionalidade deste manual: **Bruno de Oliveira Macedo**, **Felipe Fontana Alpert**, **Henrique Margato** e **Lucas Henrique Gonçalves Gomes**.

Agradecemos, também, à **Francisca Alves de França** (Dona Fran) pelo apoio.

Nosso agradecimento especial é destinado ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Capel Cardoso** por nos guiar através da construção do nosso próprio conhecimento; sua orientação foi essencial para a elaboração desse material.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. OBJETIVOS	7
1.2. ORIENTAÇÕES DE CUIDADOS GERAIS	7
1.3. MATERIAIS BÁSICOS, FIGURA 2	8
1.4. LOCALIZAÇÃO DOS MATERIAIS BÁSICOS NO LABORATÓRIO DE BIOMATERIAIS E BIOQUÍMICA ORAL	8
2. BALANÇA ANALÍTICA OHAUS ADVENTURER AR2140	11
2.1. INFORMAÇÕES GERAIS	11
2.2. PASSO A PASSO	12
3. PREPARO DA SOLUÇÃO	16
3.1. INFORMAÇÕES GERAIS	16
3.2. PASSO A PASSO	17
4. AGITADOR MAGNÉTICO	19
4.1. INFORMAÇÕES GERAIS	19
4.2. AGITADOR MAGNÉTICO MICON MAGNETIC STIRRER MIXER VORTEXER	20
4.2.1. <i>Informações básicas</i>	20
4.2.2. <i>Passo a passo</i>	20
4.3. AGITADOR MAGNÉTICO ETICA	22
4.3.1. <i>Informações gerais</i>	22
4.3.2. <i>Passo a passo</i>	22
5. PHMETRO	23
5.1. INFORMAÇÕES GERAIS	23
5.2. PHMETRO KASVI K39-1014B	24
5.2.1. <i>Informações gerais</i>	24
5.2.2. <i>Passo a passo</i>	24
5.2. PHMETRO SARTORIUS PB-11.....	29
5.2.1. <i>Informações gerais</i>	29
5.2.2. <i>Passo a passo</i>	30
6. PIPETA DRAGON LAB TOPPETTE	33
6.1. INFORMAÇÕES GERAIS	33
6.2. PASSO A PASSO	35
7. ESPECTROFOTÔMETRO BECKMAN COULTER DU 800	39
7.1. INFORMAÇÕES GERAIS	39
7.2. PASSO A PASSO	40
8. LIMPEZA DAS VIDRARIAS	52
9. ÍNDICE DE IMAGENS	55
10. REFERÊNCIAS	57

1. Introdução

1.1. Objetivos

A espectrofotometria se refere a qualquer técnica que utilize luz para medir concentrações de espécies químicas [1]. O objetivo deste manual é normatizar a metodologia para a utilização e cuidados dos equipamentos necessários para a realização de ensaios envolvendo espectrofotometria por via líquida. São eles: a balança analítica, o agitador magnético, o pHmetro, a pipeta e o espectrofotômetro de feixe UV/visível.

Concomitantemente, será estabelecido um padrão de conduta dentro do ambiente do laboratório, Figura 1.



Figura 1: vista geral do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral.

1.2. Orientações de cuidados gerais

1.2.1. Utilizar os equipamentos de proteção individual (E.P.I.): luvas de látex, avental, sapatos fechados e calça comprida.

1.2.2. Manter as unhas aparadas para evitar a perfuração das luvas.

1.2.3. Prender os cabelos antes de entrar no laboratório.

1.2.4. Não levar alimentos ou bebidas para dentro do laboratório.

1.2.5. Manter instrumentais e equipamentos SEMPRE limpos e em seus locais de origem após o uso.

1.2.6. Em caso de acidentes com substâncias químicas, lavar abundantemente o local com água corrente e solicitar auxílio do supervisor do laboratório.

1.2.7. Caso algum equipamento ou vidraria sejam danificados, o técnico do laboratório deve ser informado.

1.3. Materiais básicos, Figura 2

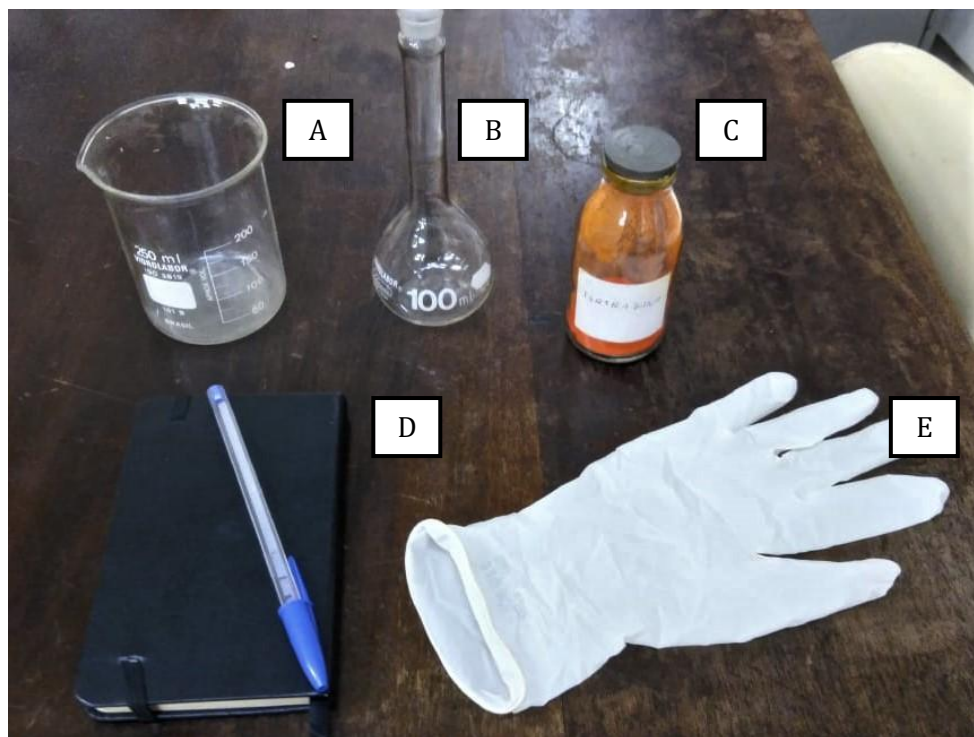


Figura 2: materiais básicos.

- A. **Béquer:** armazenará a solução final, composta pela substância a ser analisada e solvente inerte.
- B. **Balão volumétrico:** permite a medição precisa de volumes.
- C. **Substância a ser analisada:** deverá ser diluída em solvente inerte para permitir a medida do pH e a realização do ensaio.
- D. **Bloco de papel e caneta:** para as anotações das medidas aferidas.
- E. **Luva:** essencial para a proteção do usuário durante os experimentos laboratoriais.

1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral

Para facilitar a "navegação" do pesquisador dentro do Laboratório de Bioquímica serão descritos a seguir os locais onde cada material básico poderá ser encontrado.

As bancadas foram enumeradas de 1 a 6 para fins didáticos, sendo a bancada de menor número aquela localizada mais próxima à porta de entrada do laboratório, conforme demonstrado na Figura 3.



Figura 3: numeração das bancadas.

1.4.1. Béqueres: encontram-se na bancada de número 5, dentro do armário etiquetado “beckers”, conforme a Figura 4.

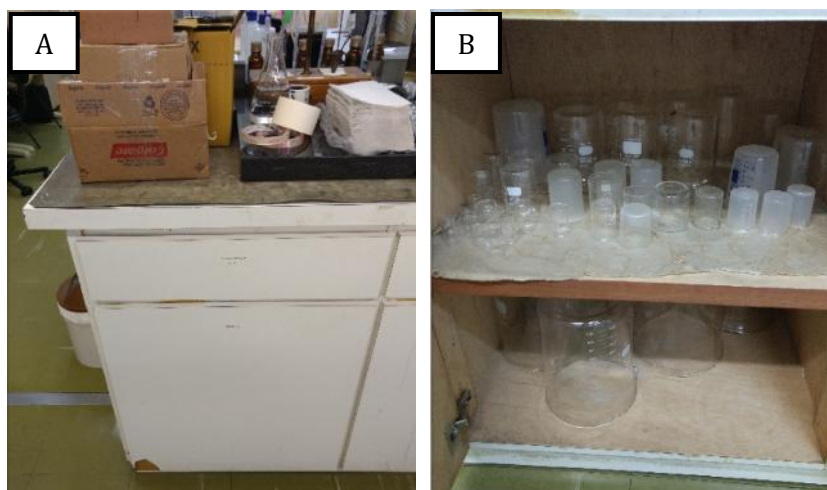


Figura 4: armário de béqueres (A) e os béqueres (B).

1.4.2. Balões volumétricos: encontram-se na bancada de número 4, dentro do armário etiquetado “balões volumétricos”, conforme a Figura 5.



Figura 5: armário de balões volumétricos (A) e balões volumétricos (B).

1.4.3. Barras magnéticas (“peixinhos”): encontram-se dentro da gaveta etiquetada “presilhas p/ diálise, cotonetes, fio dental, pipette-pump, peras, barras magnéticas” na bancada de número 4, conforme a Figura 6.



Figura 6: gaveta das barras magnéticas (à esquerda) e vista superior da gaveta, com ênfase nas barras magnéticas (retângulo vermelho à direita).

1.4.4. Galão de água deionizada: é uma alternativa de solvente inerte para o preparo da solução¹. Um dos galões se encontra próximo à bancada de número 1, ao lado da geladeira (Figura 7).



Figura 7: equipamento de produção de água deionizada. Para usá-lo, pressionar o local indicado com o polegar para que se inicie a liberação da água. Pressionar novamente para cessar a saída de água.

¹ Dependendo da solução a ser analisada no seu ensaio, consulte um técnico ou professor para confirmar qual o melhor tipo de substância inerte a ser usada.

2. Balança analítica OHAUS ADVENTURER AR2140

2.1. Informações gerais

Uma balança de precisão analítica é usada para alcançar alto rigor nos resultados. Esse grau de precisão é o que diferencia este equipamento de uma balança de precisão semi analítica.

A balança analítica pode alcançar precisão máxima de 0,1 micrograma até 0,1 miligrama. Já a balança de precisão semi analítica pesa com precisão até 0,001 grama.

Fonte: <http://www.gg.gg/bnwhm>

No Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral, ela se encontra entre a quarta e a quinta bancada, em uma mesa (Figura 8) que contém a balança, espátulas para pesagem da substância a ser analisada e pincéis para a limpeza, caso parte da substância a ser aferida caia dentro da balança ou ao seu redor.

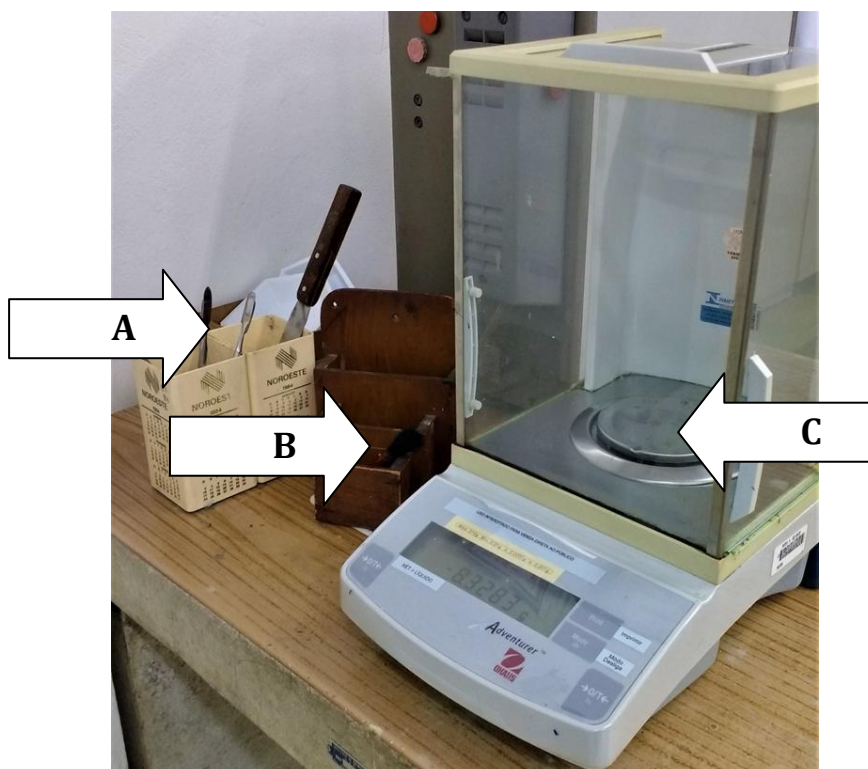


Figura 8: A: Espátulas para inserção de material sólido; B: Pincel para limpeza do local; C: balança analítica.

A. Espátulas: geralmente localizadas ao lado da balança. Devem ser utilizadas para depositar material sólido no recipiente sobre o prato da balança (Figura 9).



Figura 9: exemplo de espátula disponível para uso.

B. Recipientes e pincéis: também ao lado da balança encontram-se pequenos recipientes plásticos e papéis de seda para depositar o material a ser pesado (Figura 10), além de materiais para limpeza do local, como pincéis (Figura 11). Material em pó costuma ser depositado sobre o papel de seda dobrado (isso está mais detalhado no item 2.2).

IMPORTANTE: deve-se respeitar o limite de peso máximo da balança de 210g.

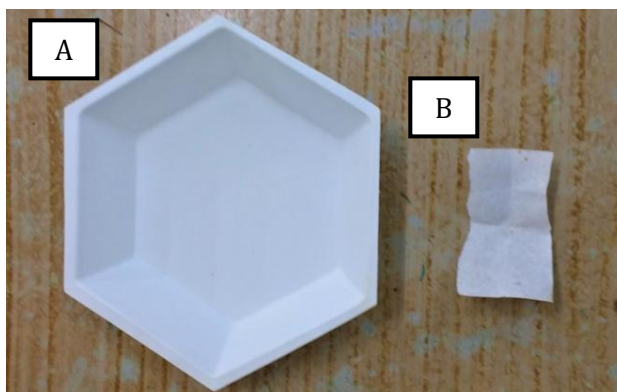


Figura 10: exemplos de recipiente plástico (A) e papel de seda (B) disponíveis.



Figura 11: pincel disponível.

C. Prato da balança analítica: sobre ele é colocado o recipiente contendo o material que se deseja pesar.

2.2. Passo a passo

2.2.1. O pesquisador deve sentar-se diante da balança analítica.

2.2.2. Separar sobre a bancada os materiais que serão utilizados: o papel de seda, a espátula, o pincel, o frasco com material cujo peso se deseja aferir e o bloco com caneta para anotações necessárias, Figura 12.



Figura 12: materiais separados sobre a bancada onde se encontra a balança analítica.

2.2.3. O papel de seda usado como recipiente deverá ser dobrado de maneira que os vincos formem um “X”, conforme apresentado na Figura 13. O objetivo dessa dobradura é concentrar o material a ser pesado no centro do papel a fim de facilitar sua futura deposição no béquer.

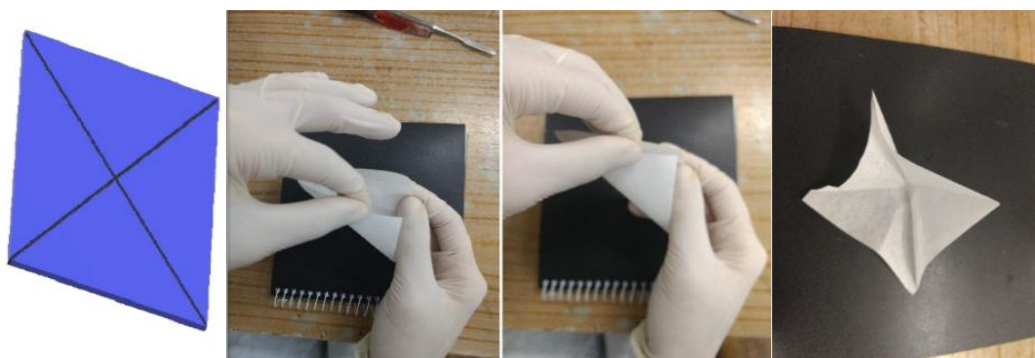


Figura 13: passo a passo da dobradura do papel de seda.

2.2.4. Ligar a balança analítica pressionando o botão “→ 0/T ←” do lado direito ou esquerdo, no painel do aparelho, Figura 14.

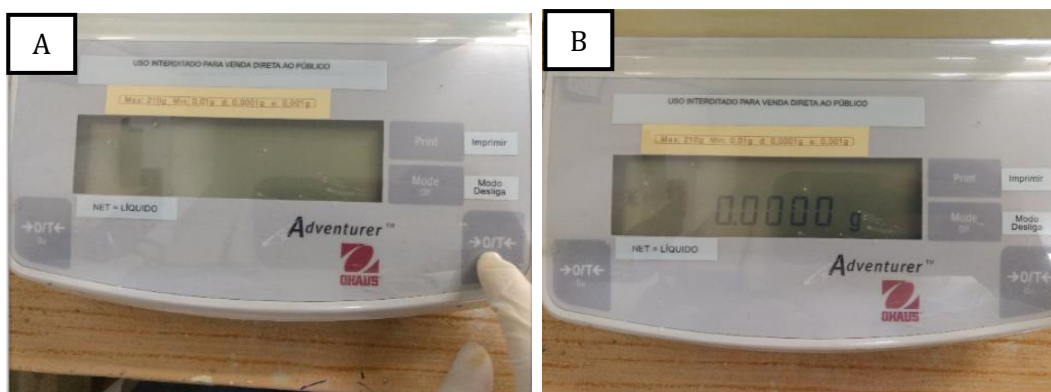


Figura 14: A: o botão a ser pressionado. B: a balança ligada e com o painel aceso.

2.2.5. Abrir uma das portas laterais e inserir o papel de seda dobrado sobre o prato da balança. A balança OHAUS Adventurer é uma balança de alta precisão, o

que implica que pequenas variações ambientais podem influenciar na aferição final. Portanto, as portas da balança devem estar fechadas durante o processo de pesagem (Figura 15).



Figura 15: passo a passo da inserção do papel de seda sobre o prato da balança.

2.2.6. Após colocar o papel dobrado sobre o prato da balança, fechar a porta lateral. Isso impede que agitações ou até mesmo pequenos golpes de ar prejudiquem a aferição.

2.2.7. O painel da balança acusará uma medida. Aguardar a estabilização dos números que aparecem no painel da balança – considera-se que o número está estabilizado quando o símbolo “*” surgir no canto esquerdo do painel (Figura 16). Em seguida, apertar novamente o botão “→ 0/T ←” (Figura 17) para tarar – ou seja, zerar – o peso do papel de seda que se encontra sobre o prato da balança.



Figura 16: símbolo * ao canto esquerdo do painel.

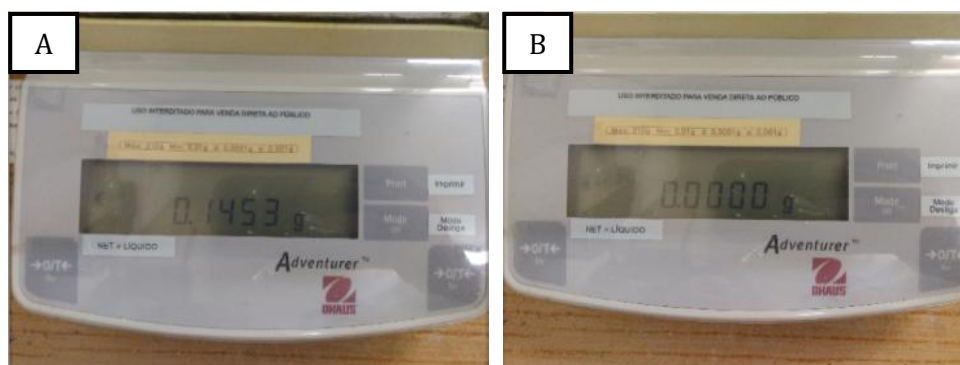


Figura 17: sequência que ilustra o como tarar a balança analítica. A: o painel mostra uma medida estabilizada e o botão “→0/T←” está sendo pressionado. B: o peso do painel está zerado.

2.2.8. Abrir a porta lateral e, com o auxílio de uma espátula (no caso de material em pó), retirar uma pequena porção do material desejado e depositá-la cuidadosamente no papel de seda sobre o prato da balança (Figura 18).

2.2.9. Fechar a porta e aguardar a estabilização dos números no painel. Caso a quantidade pesada não seja a desejada, é possível ajustá-la, adicionando ou retirando parte do material depositado sobre o papel de seda, repetindo o procedimento do item 8.

IMPORTANTE: Sempre feche a porta lateral da balança após o ajuste da quantidade e aguarde a estabilização da medida novamente.

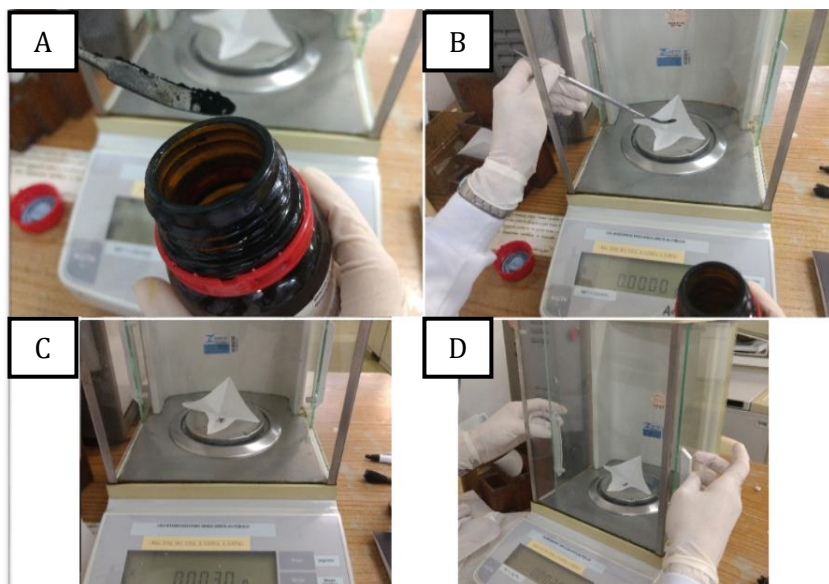


Figura 18: sequência que ilustra o material sendo retirado com a espátula e depositado sobre o papel de seda. A: amostra da substância a ser pesada; B: inserindo cuidadosamente a amostra no papel de seda já posto na balança; C: a pesagem será iniciada; D: fechamento da porta da balança.

2.2.10. Ao se atingir o valor almejado, abrir a porta e retirar cuidadosamente o papel de seda contendo o material.

2.2.11. Para desligar a balança, pressionar o botão “Mode OFF” (Figura 19) por aproximadamente 5 segundos. O painel será apagado.



Figura 19: botão “Mode OFF” sendo pressionado”.

2.2.12. Limpar com o pincel quaisquer resíduos que, por acidente, tenham caído durante o trajeto entre o recipiente e a balança (Figura 20). Para casos de maiores extravasamentos, utilizar um papel absorvente levemente umedecido em água. Esse passo permite que a balança esteja sempre limpa e pronta para uso pelo próximo usuário.

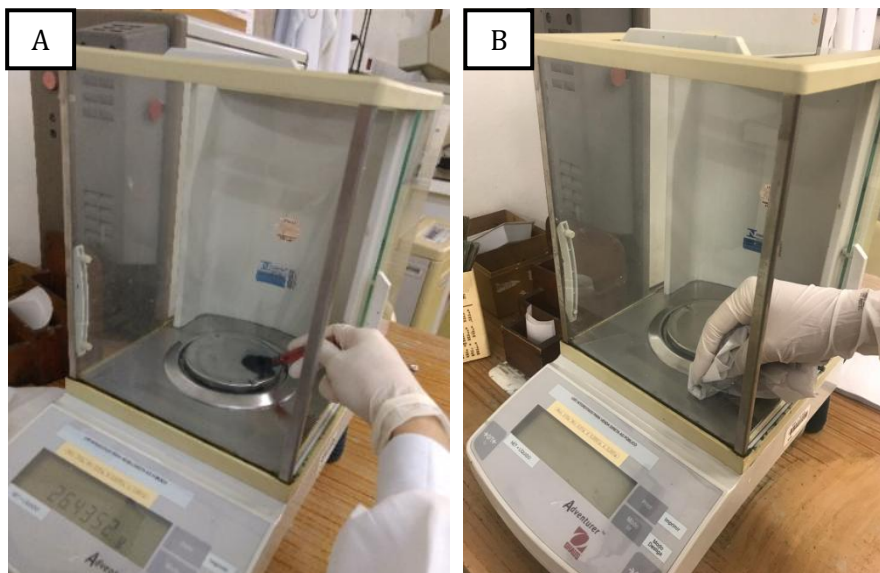


Figura 20: A: limpeza da balança com o pincel; B: limpeza da balança com papel absorvente úmido.

2.2.13. Transferir o material pesado para um béquer. Descartar o papel de seda na lixeira. A espátula deve ser higienizada, assim como o recipiente plástico, se este for utilizado (consultar o item **8. Limpeza das vidrarias**).

3. Preparo da solução

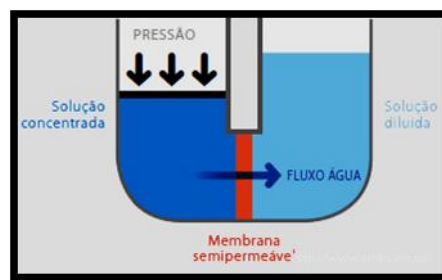
3.1. Informações gerais

Uma solução deve ser preparada com o material pesado (como visto no item **2. Balança analítica OHAUS ADVENTURER AR2140**) e com o solvente de escolha – por exemplo, água deionizada ou álcool.

Observação: quando o veículo é a água deionizada, a sua obtenção é através de um mecanismo de osmose reversa.

Osmose reversa é um processo pelo qual uma solução é comprimida contra uma membrana permeável para solutos de baixa massa molecular (como sais ou moléculas orgânicas simples), porém impermeável para o solvente. Essa separação ocorre apenas na presença de grandes pressões sobre a mistura, contrariando o fluxo natural da osmose. Pode ser utilizado para dessalinização de água do mar, produção de produtos químicos, irrigação, entre outros.

Água deionizada é um tipo de água que passa por um processo de purificação, ficando completamente livre dos íons presentes na água; porém, são retidas substâncias sem carga elétrica, orgânicas ou inorgânicas. Há ainda a eliminação de minerais, metais e outras substâncias que possam causar contaminação. Devido à retenção de substâncias sem cargas, o líquido não pode ser considerado puro.



Fonte: <http://www.gg.gg/boeo>; <http://www.gg.gg/cf3g>; <http://www.gg.gg/cf3h2>.

Para esse procedimento são essenciais um béquer e um balão volumétrico. Se necessário, consultar o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral** para localizar esses materiais no laboratório.

3.2. Passo a passo

3.2.1. Preencher um béquer com água deionizada com o volume a ser utilizado no preparo da solução. Para isso, posicionar o béquer abaixo da saída do filtro (à direita da máquina) e pressionar o botão “SIM” no painel, conforme indicado na Figura 21. O botão não deve ser mantido pressionado durante seu uso; apenas deve ser pressionado e solto para liberar o líquido e, em seguida, pressionado e solto novamente para cessar o fluxo. É possível que o galão pause o fornecimento da água para que esta seja pressurizada; nesse caso, é necessário aguardar alguns segundos para apertar o botão “SIM” outra vez.

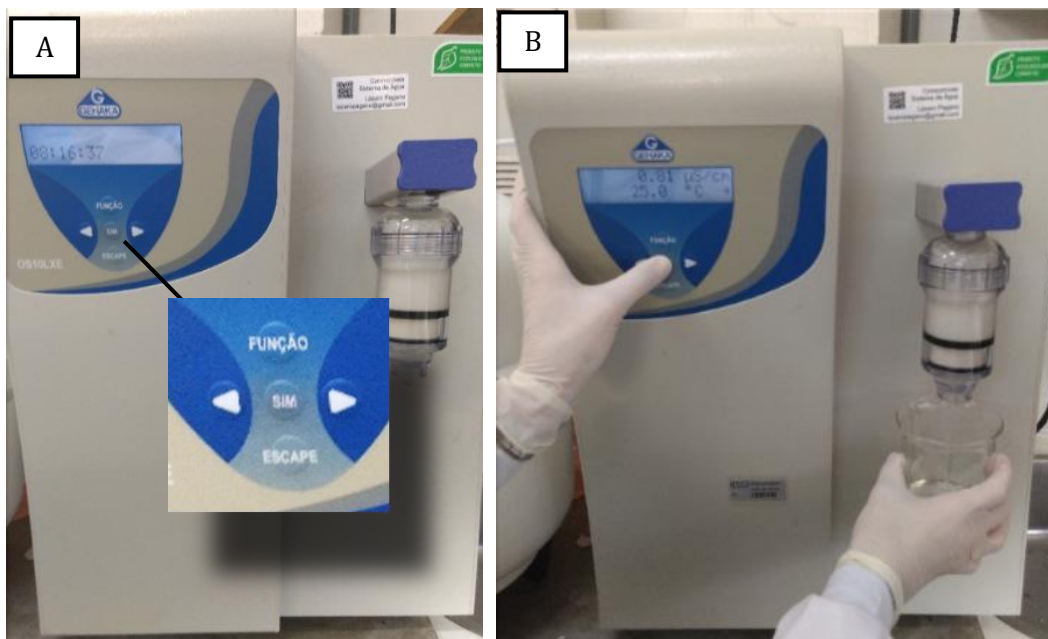


Figura 21: equipamento de água deionizada. O botão “SIM” (círculo em A) deve ser pressionado para a saída da água. A posição em que o béquer deve ser mantido está ilustrada em B.

3.2.2. Transferir o conteúdo do béquer para o balão volumétrico para medir o volume de forma mais precisa. Nele, a altura do líquido deve atingir a linha no pescoço do balão, de modo que o volume seja correspondente àquele escrito no corpo (Figura 22).

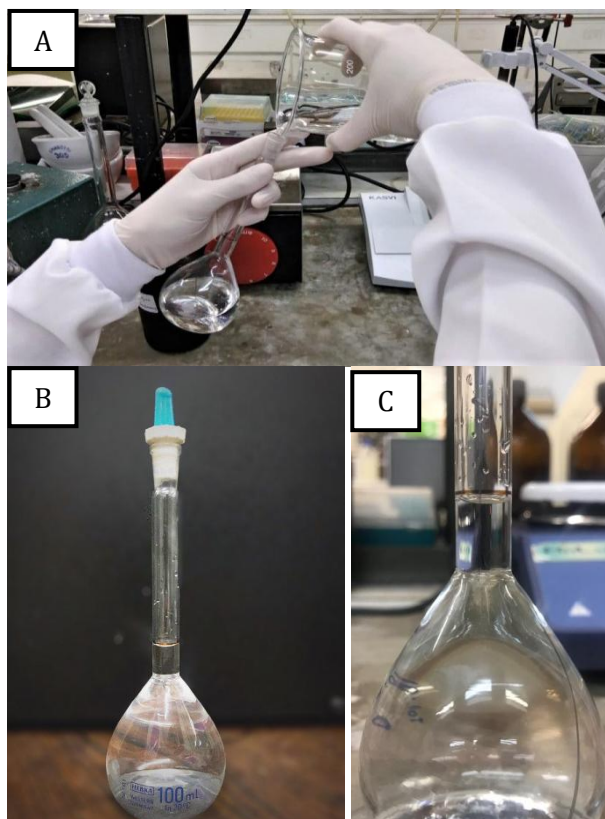


Figura 22: A: água sendo transferida do béquer para o balão volumétrico. B: balão volumétrico preenchido em vista frontal. C: marcação que deve ser atingida (menisco) ao preencher o balão volumétrico.

3.2.3. Em seguida, retornar o volume de volta ao béquer e acrescentar o material que se deseja diluir (Figura 23) – neste caso, o pó que foi pesado no item 2. **Balança analítica OHAUS ADVENTURER AR2140.**

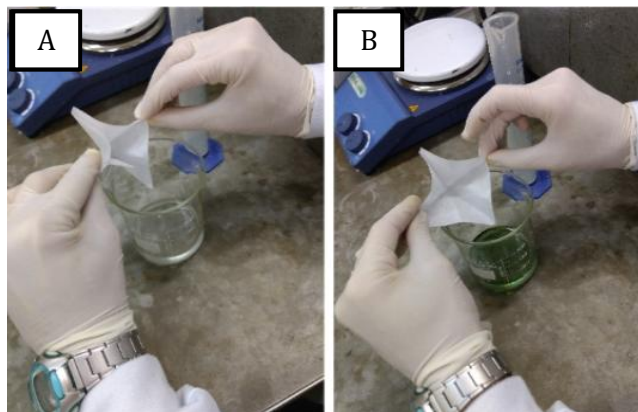


Figura 23: sequência que ilustra a transferência do material em pó no béquer, de modo que este seja diluído no volume de água previamente medido no balão. A: início do despejo da substância em um béquer; B: fim do despejo da substância em um béquer.

3.2.4. Caso haja a necessidade de novas diluições a partir da solução preparada, deve-se pipetá-la em um novo volume de água aferido no balão volumétrico. Para a homogeneização da mistura é preciso fechar a abertura do balão com sua respectiva rolha e, cuidadosamente, agitar o balão, Figura 24.

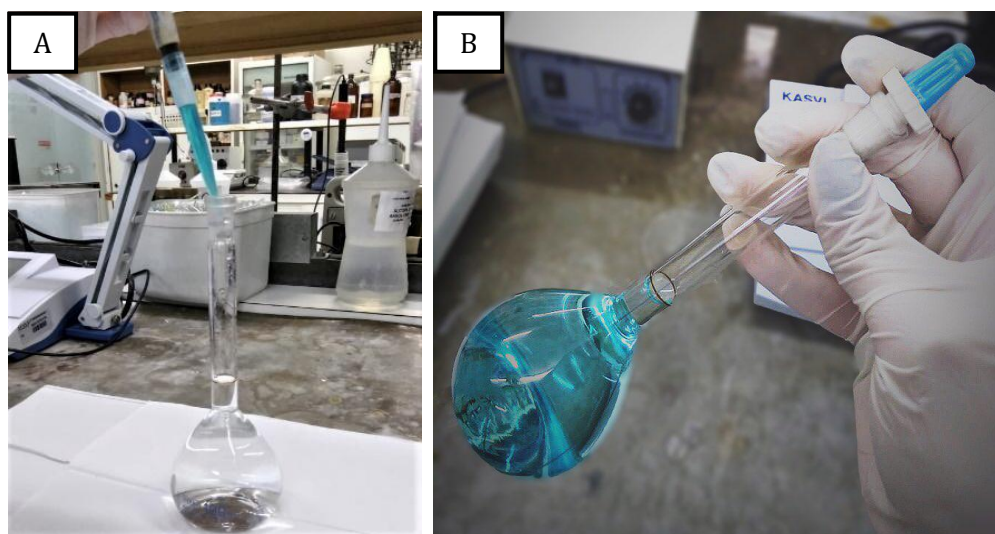


Figura 24: em A, a solução sendo pipetada na água contida no balão volumétrico. Em B, a solução sendo homogeneizada.

3.2.5. Separar o balão volumétrico com a solução preparada. Após o uso, o béquer e o balão devem ser higienizados (consultar o item 8. **Limpeza das vidrarias**).

4. Agitador magnético

4.1. Informações gerais

O agitador magnético é um aparelho utilizado para homogeneizar soluções por longos períodos de tempo (de minutos a horas), não devendo ser utilizado com líquidos viscosos ou soluções de grande heterogeneidade.

É composto por um motor de velocidade regulável ligado a um ímã. Este ímã provoca o movimento rotacional da barra magnética (“peixinho”) dentro do material a ser agitado através de campo magnético.

No Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral é possível encontrar dois modelos de agitadores magnéticos: o **MICON Magnetic Stirrer Mixer Vortexer** e o **ETICA**. Ambos os aparelhos possuem a mesma finalidade e eficiência, portanto, a escolha fica a critério da disponibilidade do aparelho e preferência do usuário.

Para a agitação magnética é necessário o uso de um béquer. Portanto, a solução deve ser proporcionada no balão volumétrico e depois colocada no béquer para agitação.

4.2. Agitador magnético MICON Magnetic Stirrer Mixer Vortexer

4.2.1. Informações básicas

O aparelho pode ser encontrado na bancada de número 6 (se necessário, consulte o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral**). Não apresenta botão de liga/desliga, sendo ativado com a rotação do botão vermelho (Figura 25), contanto que esteja conectado à tomada da rede elétrica.



Figura 25: agitador magnético MICON (vista frontal).

4.2.2. Passo a passo

4.2.2.1. Na gaveta das barras magnéticas (se necessário, consulte o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral**), procurar um “peixinho” de tamanho correto. É necessário que o comprimento do “peixinho” seja menor do que o diâmetro do béquer, de modo a evitar impacto nas paredes do béquer durante a agitação, o que poderia causar a sua fratura. Observar a comparação entre um “peixinho” inadequado e um “peixinho” adequado na Figura 26.

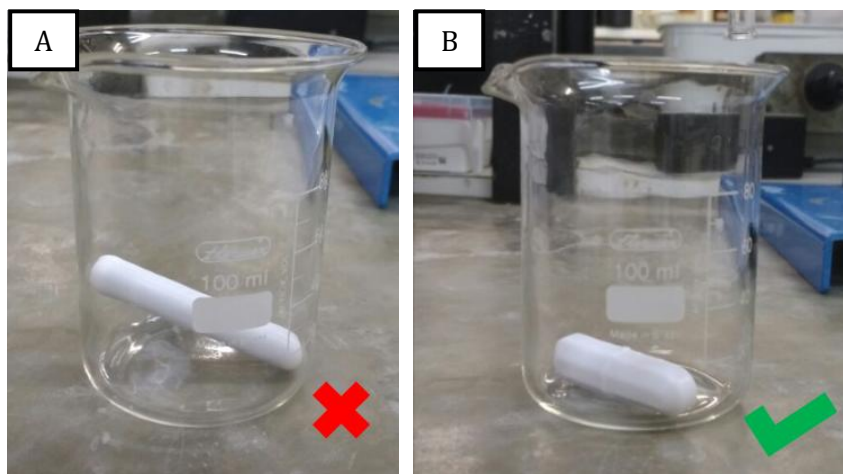


Figura 26: em A, o “peixinho” de tamanho inadequado, com comprimento maior que o diâmetro do béquer, encostando em uma das paredes laterais do béquer. Em B, o peixinho de tamanho correto, posicionado no fundo do béquer sem encostar-se às paredes laterais do béquer.

4.2.2.2. Centralizar o béquer contendo a solução com “peixinho” sobre a placa metálica do agitador magnético. Girar lentamente o botão vermelho no sentido horário até ouvir um “clique” e visualizar o acendimento da luz vermelha em cima do botão (Figura 27). Isso indica que o aparelho está ligado.

4.2.2.3. Selecionar a frequência de rotação girando lentamente o botão vermelho no sentido horário, para aumentá-la, ou no sentido anti-horário, para reduzi-la. A frequência de rotação ideal é aquela que permite a homogeneização da solução sem provocar seu respingo para fora do béquer ou o impacto da rotação do “peixinho” em suas paredes, o que poderia levar à fratura do vidro. Para evitar isso, é fundamental manipular lentamente o botão vermelho.

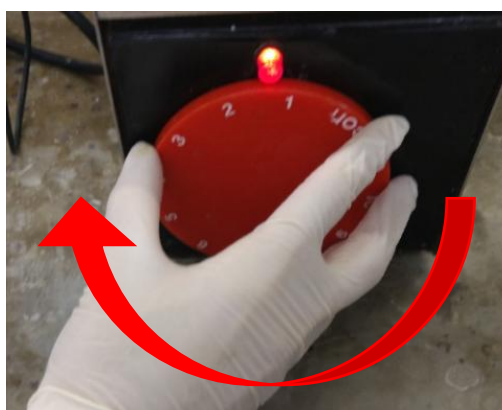


Figura 27: ao iniciar a rotação do botão em sentido horário, o usuário perceberá um “clique” e o acendimento da luz vermelha em cima do botão, indicando que o aparelho foi ligado.

4.2.2.4. Manter a agitação da solução até observar sua completa homogeneização.

4.2.2.5. Para desligar o agitador, girar o botão vermelho no sentido anti-horário até que se perceba o “clique” do botão e o apagamento da luz vermelha do aparelho.

4.3. Agitador magnético ETICA

4.3.1. Informações gerais

Pode ser encontrado na bancada de número 3, ao lado do pHmetro (se necessário, consulte o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral**). Apresenta o botão de liga/desliga verde e o botão de rotação preto, Figura 28.



Figura 28: agitador magnético ETICA (vista frontal).

4.3.2. Passo a passo

4.3.2.1. Na gaveta das barras magnéticas (se necessário, consulte o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral**), procurar um “peixinho” de tamanho adequado ao béquer. É necessário que o comprimento do “peixinho” seja menor do que o diâmetro do béquer, de modo a evitar impacto nas paredes do béquer durante a agitação, o que poderia causar a sua quebra. Observar a comparação entre um “peixinho” inadequado e um “peixinho” adequado na Figura 26.

4.3.2.2. Posicionar o béquer contendo a solução com “peixinho” sobre a placa metálica do agitador magnético. Pressionar o botão verde; ele se acenderá. Isso indica que o aparelho está ligado.

4.3.2.3. Selecionar a frequência de rotação girando lentamente o botão preto no sentido horário para aumentá-la ou no sentido anti-horário para reduzi-la, Figura 29. A frequência de rotação ideal é aquela que permite a homogeneização da solução sem provocar seu respingo para fora do béquer ou o impacto da rotação do “peixinho” em suas paredes, o que poderia levar à quebra do vidro. Para evitar isso, é fundamental manipular lentamente o botão preto.

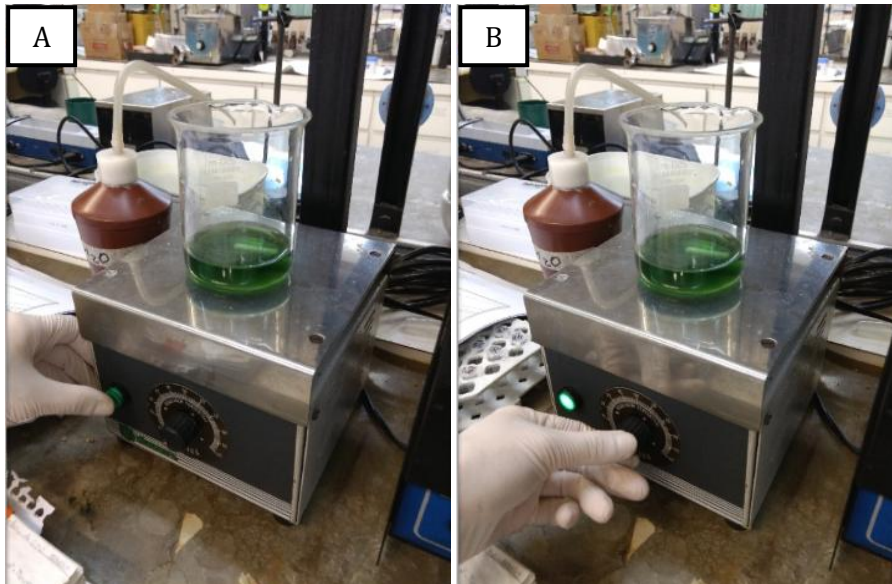


Figura 29: em A, o botão verde sendo pressionado; em B, o botão verde aceso e o botão preto sendo girado.

4.3.2.4. Manter a agitação da solução até observar sua completa homogeneização.

4.3.2.5. Para desligar o agitador, pressionar o botão verde (a luz apagará) e girar o botão preto completamente no sentido anti-horário.

5. PHmetro

5.1. Informações gerais

O pHmetro é um aparelho cuja finalidade é a aferição do pH de uma substância. É composto por um painel de leitura capaz de regular a unidade de medida em milivolt (mV) e pH. Também possui comandos de calibragem utilizando como base as substâncias padrões com valores de pH pré-estabelecidos.

O eletrodo de bulbo altamente sensível conectado ao aparelho deverá ser introduzido na substância a ter seu pH aferido. Devido à fragilidade do bulbo de aferição, este jamais deve ser mantido sem a capa de proteção ou fora de um meio aquoso por longos períodos, sob risco de ressecar o eletrodo e danificar o aparelho.

O Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral apresenta dois modelos de pHmetro: o modelo KASVI K39-1014B e o modelo Sartorius PB-11. Ambos os aparelhos se encontram na bancada 6 (se necessário, consulte o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral**). Ambos os aparelhos possuem a mesma finalidade e eficiência, portanto, a escolha fica a critério da disponibilidade do aparelho e preferência do usuário.

5.2. PHmetro KASVI K39-1014B

5.2.1. Informações gerais

O pHmetro KASVI K39-1014B (Figura 30) possibilita calibragem manual, poupando o tempo que se perderia aguardando a estabilização de leitura da solução padrão. Seu eletrodo é um tubo acrílico preto.

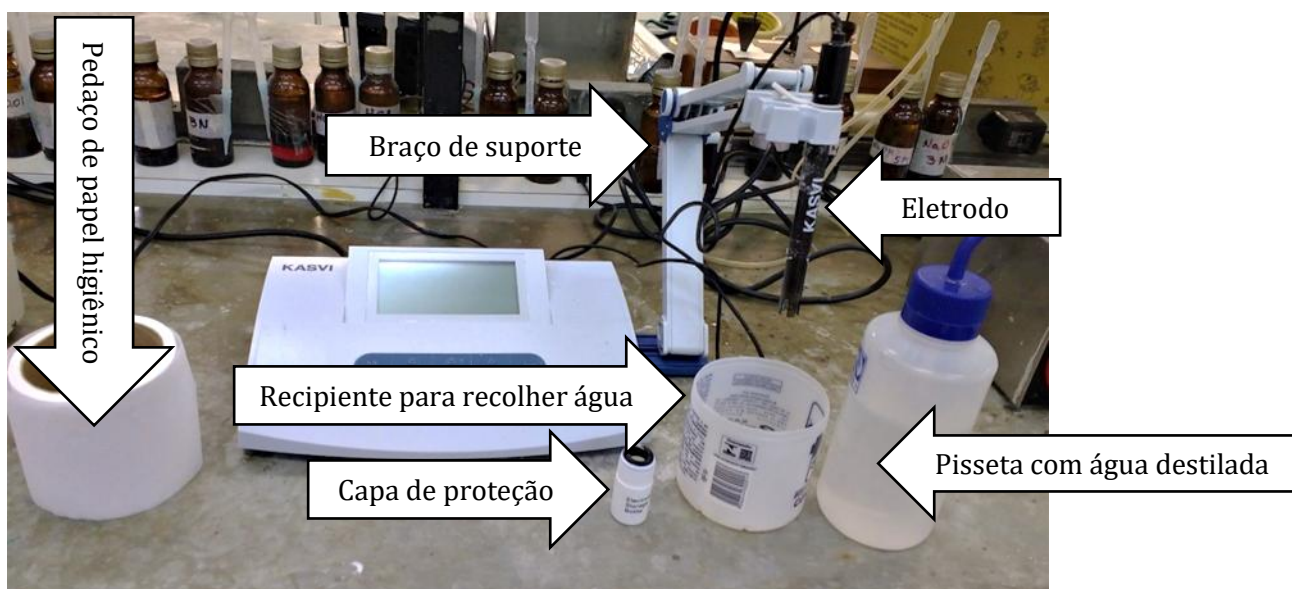


Figura 30: pHmetro KASVI (vista frontal) e materiais essenciais para seu uso.

5.2.2. Passo a passo

5.2.2.1. Ligar o pHmetro KASVI pressionando o botão “On/Off” na parte posterior do aparelho, Figura 31.

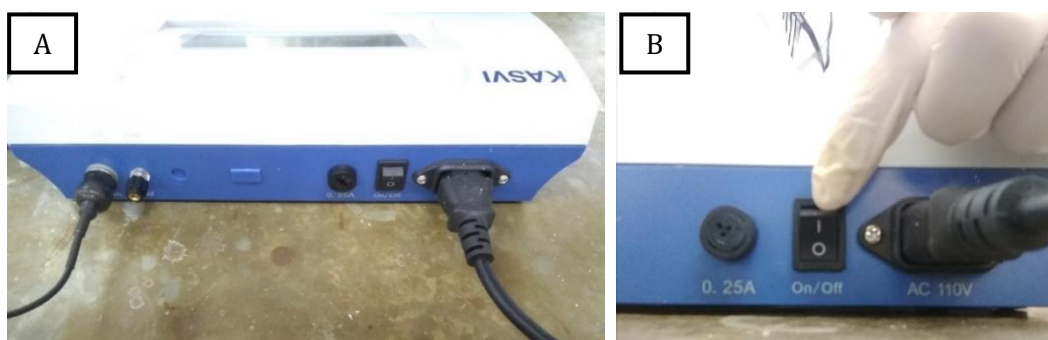


Figura 31: em A, vista posterior do pHmetro KASVI; em B, o botão On/Off.

5.2.2.2. Observar o acionamento do painel de leitura. Inicialmente, o aparelho estará ajustado para leituras em milivolt (mV). Para aferições de pH, apertar o botão “pH/mV” do lado esquerdo do painel para efetuar a troca da leitura de milivolt para pH, conforme ilustrado na Figura 32. O pH inicialmente mostrado no visor será o da solução de cloreto de potássio contida na capa de proteção do bulbo. O cloreto de potássio serve para manter o eletrodo em condições ideais de armazenamento.



Figura 32: sequência que ilustra a mudança de mV para pH.

5.2.2.3. Remover a capa de proteção do eletrodo cuidadosamente, realizando movimentos rotacionais e puxando a capa e o eletrodo em sentidos opostos (Figura 33).

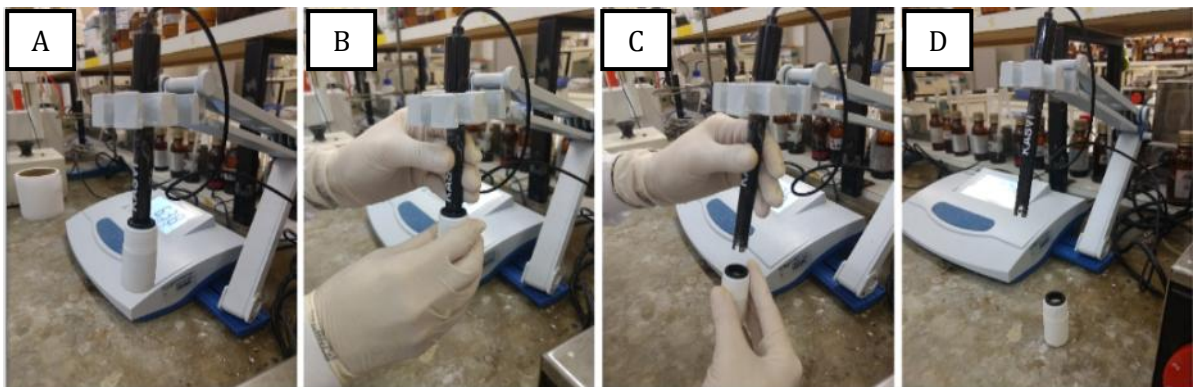


Figura 33: A: posicionamento dos componentes do aparelho; B: segurar com uma mão o eletrodo, e com a outra, a capa de proteção; C: com movimentos circulares em sentidos opostos, puxar cuidadosamente a capa de proteção; D: finalização da sequência de retirada da capa de proteção que protege o eletrodo.

5.2.2.4. Retirar o eletrodo do suporte, puxando-o por cima do encaixe, Figura 34.

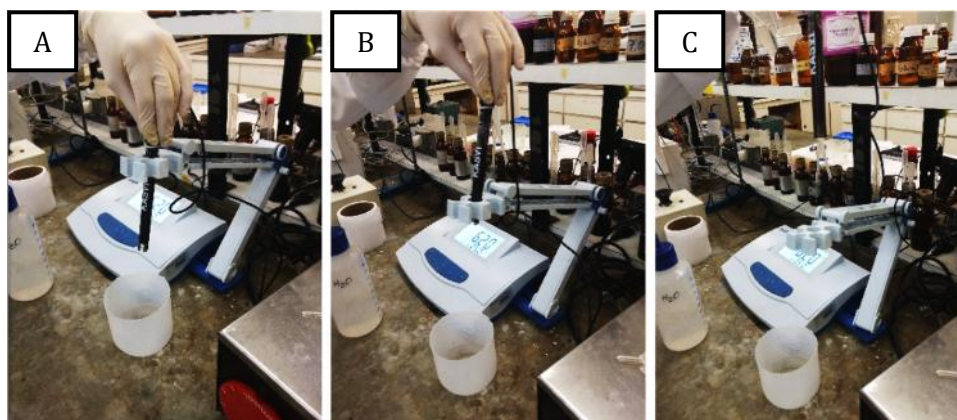


Figura 34: sequência de retirada do eletrodo do suporte.

5.2.2.5. Com a pisseta de água destilada, realizar uma extensa lavagem da ponta do eletrodo a fim de retirar resíduos da solução de cloreto de potássio contida na capa de proteção. Manter um recipiente plástico abaixo para que a água escoada durante a lavagem seja coletada (Figura 35).

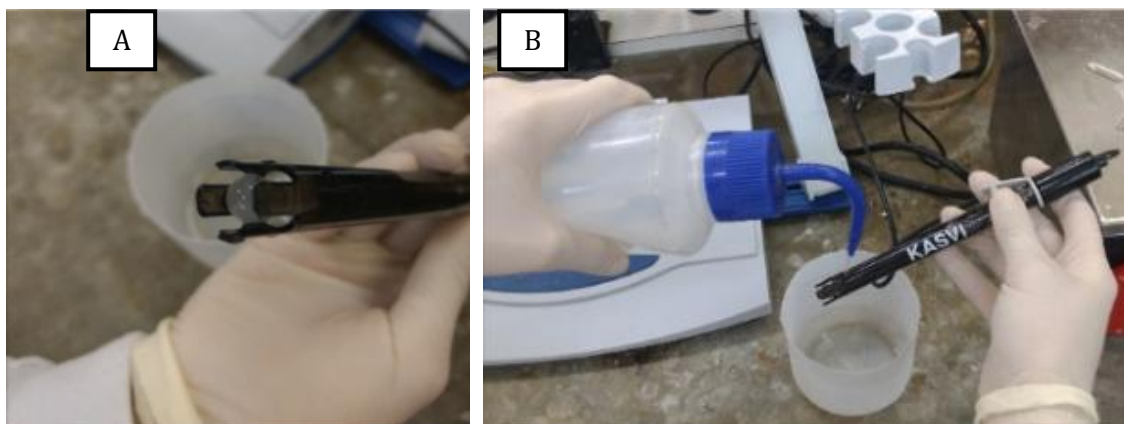


Figura 35: em A, detalhe da ponta do eletrodo; em B, a lavagem da ponta do eletrodo.

5.2.2.6. Após a lavagem, apoiar levemente a ponta do bulbo em um pedaço de papel absorvente, previamente preparado para sugar o excesso de água do eletrodo (Figura 36).

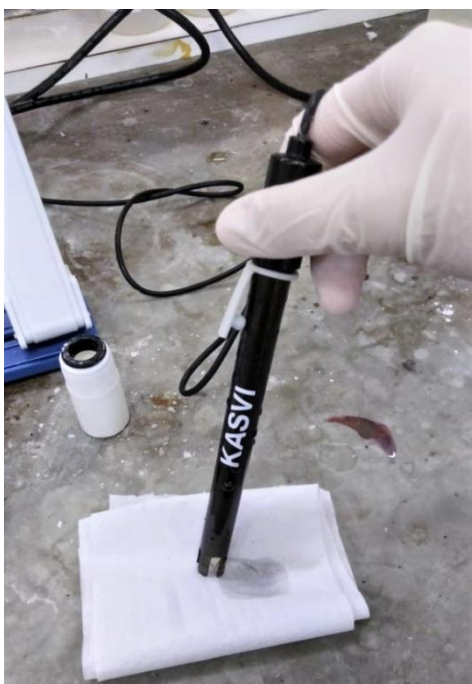


Figura 36: secagem da ponta do eletrodo no pedaço de papel higiênico.

5.2.2.7. Após lavar e secar o eletrodo, a calibragem do aparelho é fundamental para uma medição precisa. Para isso, pendurar o eletrodo de volta no suporte e selecionar uma solução padrão de pH=7, encontrada em frasco âmbar na parte superior da bancada. Inserir a ponta do eletrodo no frasco de pH = 7 e manter o eletrodo imerso nessa solução até que o valor mostrado no visor do pHmetro estabilize (Figura 37). Durante a calibração, caso o valor observado no visor seja exatamente aquele da solução padrão de pH = 7, não é preciso realizar a calibração

manual descrita nos passos 8 ao 11. Porém, é comum que seja apresentado um valor com décimos de diferença daquele da solução.

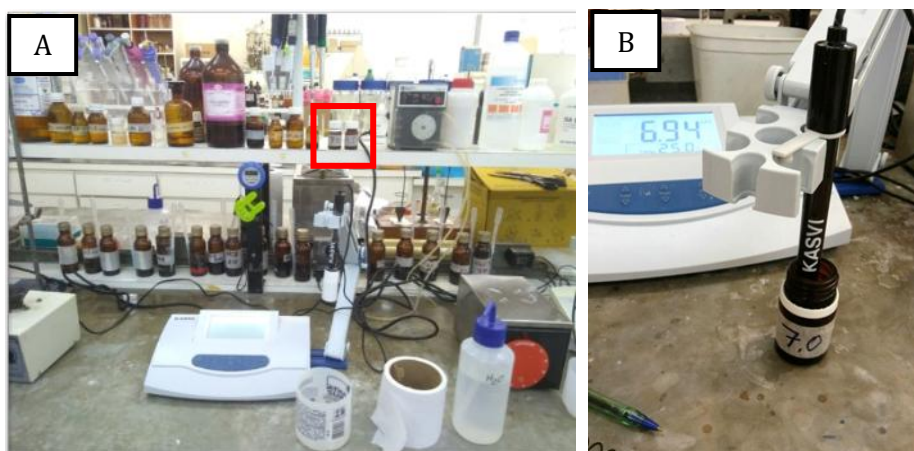


Figura 37: em A, a localização das soluções padrão na bancada (retângulo vermelho); em B, a ponta do eletrodo imersa no frasco de pH = 7.

5.2.2.8. Para iniciar a calibração manual do pHmetro, pressionar qualquer uma das setas do botão “Std” (Standard). Em seguida, a mensagem “Std YES” aparecerá no visor do aparelho (Figura 38).

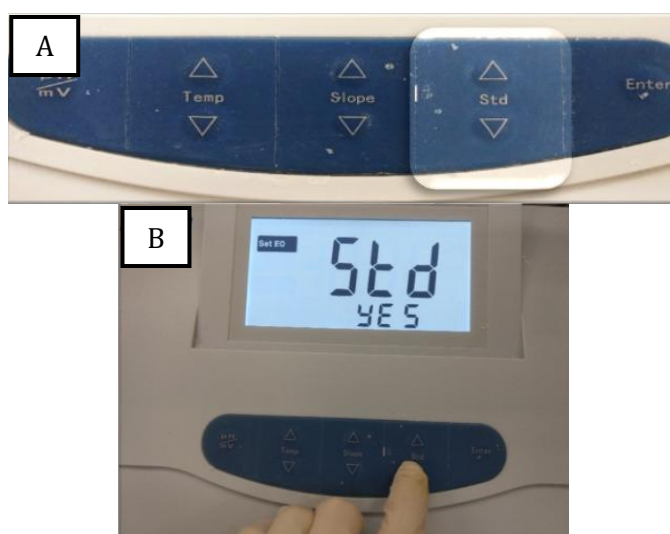


Figura 38: o botão Std é composto por duas setas (A); após uma delas ser pressionada, a mensagem “Std YES” aparece no visor (B).

5.2.2.9. Para o usuário confirmar que deseja iniciar a calibração manual, pressionar o botão “Enter” (Figura 39). No visor, o valor do pH lido pelo aparelho surgirá novamente. Como a substância padrão utilizada neste manual tem valor pré-determinado em pH 7, espera-se que a leitura esteja próxima a este valor.



Figura 39: botão “Enter” sendo pressionado.

5.2.2.10. De acordo com o valor de pH apresentado no visor, o usuário deverá ajustá-lo até atingir o valor de 7,00 pressionando os botões “Std” seta para cima (aumento do pH) e “Std” seta para baixo (redução do pH). Observar a Figura 40.



Figura 40: A: demonstração do local das setas; B: setas do botão “Std” sendo pressionadas até que o visor apresente o pH 7; C: correspondência do valor à solução padrão.

5.2.2.11. Depois de calibrar o pHmetro, o frasco de solução padrão poderá ser retirado do eletrodo, fechado e devolvido ao seu lugar original. A ponta do eletrodo do pHmetro, por sua vez, deverá passar pelas etapas de lavagem e secagem descritas nos itens 5 e 6.

5.2.2.12. É hora de aferir o pH do líquido desejado. Caso o líquido seja uma solução – ou seja, uma mistura – é interessante que ele esteja sendo constantemente agitado durante a aferição de pH. Para isso, mergulhar na solução uma barra magnética (“peixinho”) e mantê-la sobre um agitador magnético (se necessário, consulte o item **4. Agitador magnético**).

5.2.2.13. Introduzir cuidadosamente a ponta do eletrodo dentro do béquer contendo a solução. O motivo disso é evitar que a ponta do eletrodo encoste no “peixinho” sob agitação, uma vez que esta ponta é constituída de vidro e está sujeita à quebra, resultando na perda funcional do aparelho. Desta forma, deve-se garantir que a ponta do eletrodo esteja submerso na solução com uma distância segura do “peixinho” para que não se choquem. Além disso, deve-se deixar o eletrodo seguro no braço de suporte de pHmetro para que ele mantenha uma posição estável até a completa aferição do pH. Observar esses detalhes na Figura 41.

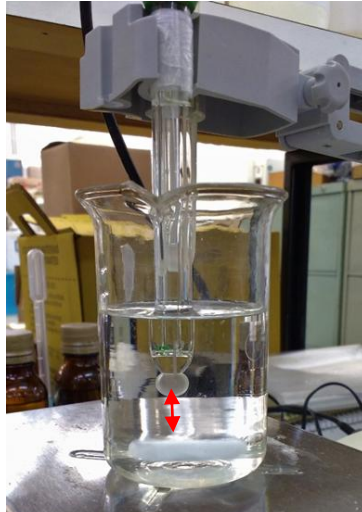


Figura 41: ao mesmo tempo em que a ponta do eletrodo está totalmente submersa na solução, há uma distância segura entre ela e o “peixinho” em agitação (seta). Reparar também que o eletrodo está preso no braço do pHmetro (observação: esse é o eletrodo do pHmetro Sartorius).

5.2.2.14. Nesse aparelho não observamos nenhuma indicação da estabilização da leitura do pH na tela. Apenas deve-se aguardar até o pH apresentar somente oscilações esparsas, em torno de um mesmo valor. Isso leva aproximadamente 10 minutos. Após a estabilização, anotar o pH apresentado.

5.2.2.15. Concluída a aferição de pH, desligar o agitador magnético, retirar a ponta do eletrodo do béquer e submetê-la às etapas de lavagem e secagem descritas nos itens 5 e 6. Em seguida, recolocar a capa de proteção e posicionar o eletrodo em sua posição original no suporte do pHmetro.

5.2.2.16. Desligar o aparelho pressionando o mesmo botão que usou para ligá-lo, atrás do equipamento (Figura 31).

5.2. PHmetro Sartorius PB-11

5.2.1. Informações gerais

O pHmetro Sartorius PB-11, Figura 42 não possibilita calibragem manual. Desse modo, ao se calibrar o aparelho, o usuário deve aguardar o tempo necessário para a leitura e estabilização do valor da solução padrão. Seu eletrodo é um tubo de vidro transparente.

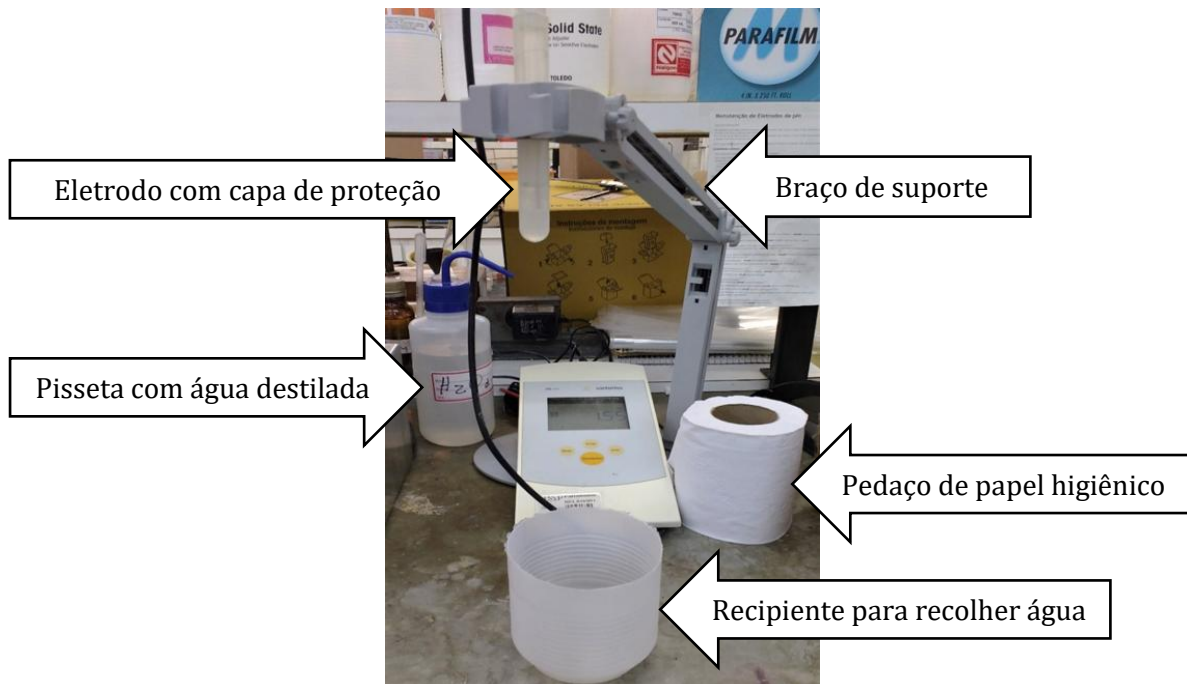


Figura 42: pHmetro Sartorius (vista frontal) e materiais essenciais para seu uso.

5.2.2. Passo a passo

5.2.2.1. Ligar o aparelho na tomada. O aparelho não apresenta botão de “liga/desliga” e a inserção do transformador do aparelho na tomada já o liga. Observar o acendimento do visor do painel.

5.2.2.2. Remover o eletrodo cuidadosamente da capa de proteção, puxando-o com rotações para cima (Figura 43). A capa de proteção ficará retida no suporte do pHmetro.

5.2.2.3. Com a pisseta de água destilada, realizar uma extensa lavagem da ponta do eletrodo a fim de retirar resíduos da solução de cloreto de potássio contida na capa de proteção. Manter o recipiente plástico abaixo, para que a água escoada durante a lavagem seja coletada (Figura 43).

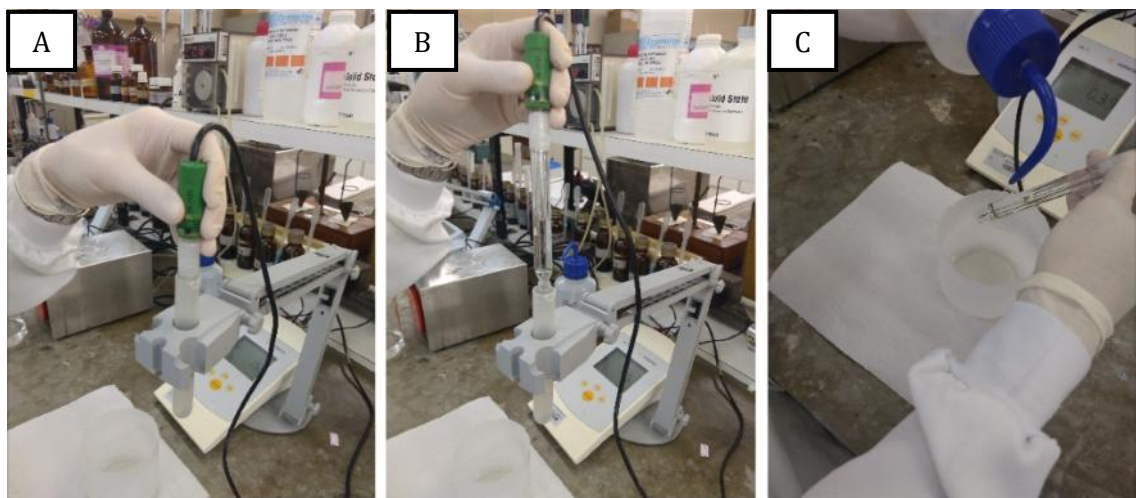


Figura 43: em A, o eletrodo sendo retirado da capa de proteção; em B, a capa de proteção retida no suporte; em C, a lavagem da ponta do eletrodo.

5.2.2.4. Após a lavagem, apoiar levemente a ponta do eletrodo em um pedaço de papel higiênico enrolado, previamente preparado para sugar o excesso de água do eletrodo.

5.2.2.5. Após lavar e secar o eletrodo, a calibragem do aparelho é fundamental para uma medição precisa. Para isso, pendurar o eletrodo de volta no suporte e selecionar uma solução padrão de pH=7, encontrada em frasco âmbar na parte superior da bancada. Inserir a ponta do eletrodo no frasco de pH = 7 e manter o eletrodo imerso nessa solução até que o valor mostrado no visor do pHmetro estabilize. Observar a Figura 44.



Figura 44: ponta do eletrodo sendo inserida na solução padrão de pH = 7.

5.2.2.6. Diferentemente do pHmetro KASVI, o usuário deverá aguardar a estabilização da leitura, que será concluída quando o visor do pHmetro acusar o símbolo “S” (Figura 45). Em seguida, pressionar o botão “Standardize” para definir o valor obtido na leitura da substância padrão como ponto de calibração (Figura 46).



Figura 45: estabilização da leitura de pH da solução padrão, com surgimento do símbolo “S” no visor.



Figura 46: o botão "Standardize" sendo pressionado para calibrar o aparelho com o valor obtido na leitura da solução padrão.

5.2.2.7. Depois de calibrar o pHmetro, o frasco de solução padrão poderá ser retirado do eletrodo, fechado e devolvido ao seu lugar original. A ponta do eletrodo do pHmetro, por sua vez, deverá passar pelas etapas de lavagem e secagem descritas nos itens 3 e 4.

5.2.2.8. É hora de aferir o pH do líquido desejado. Caso o líquido seja uma solução – ou seja, uma mistura – é interessante que ele esteja sendo constantemente agitado durante a aferição de pH. Para isso, mergulhar na solução uma barra magnética (“peixinho”) e mantê-la sobre um agitador magnético (se necessário, consulte o item **4. Agitador magnético**).

5.2.2.9. Inserir cuidadosamente a ponta do eletrodo dentro do béquer contendo a solução. O motivo disso é evitar que a ponta do eletrodo encoste no “peixinho” sob agitação, uma vez que esta ponta é constituída de vidro e está sujeita à quebra, resultando na perda funcional do aparelho. Desta forma, deve-se garantir que a ponta do eletrodo esteja submersa na solução com uma distância segura do “peixinho” para que não se choquem. Além disso, deve-se deixar o eletrodo seguro no braço de suporte de pHmetro para que ele mantenha uma posição estável até a completa aferição do pH (Figura 47).

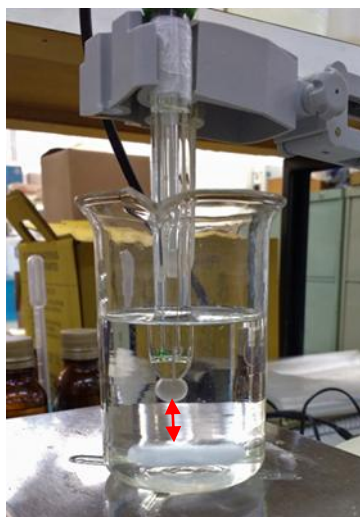


Figura 47: ao mesmo tempo em que a ponta do eletrodo está totalmente submersa na solução, há uma distância segura entre ela e o “peixinho” em agitação (seta). Reparar também que o eletrodo está preso no braço do pHmetro.

5.2.2.10. A estabilização da leitura do pH da solução será indicada pelo símbolo “S” no visor. Após a estabilização, anotar o pH apresentado.

5.2.2.11. Concluída a aferição de pH, desligar o agitador magnético, retirar a ponta do eletrodo do béquer e submetê-la às etapas de lavagem e secagem descritas nos itens 3 e 4. Em seguida, recolocar a capa de proteção e posicionar o eletrodo em sua posição original no suporte do pHmetro.

5.2.2.12. Desligar o aparelho, retirando o cabo de força da tomada.

6. Pipeta DRAGON LAB TopPette

6.1. Informações gerais

A pipeta serve para medir e transferir volume de soluções líquidas e funciona com o sistema de vácuo. Ela é constituída pelas seguintes partes: o êmbolo, o botão giratório, o botão lateral, o corpo da pipeta e o suporte para ponta descartável (Figura 48). A ponta descartável é a parte não fixa da pipeta que entrará em contato com a solução a ser pipetada.

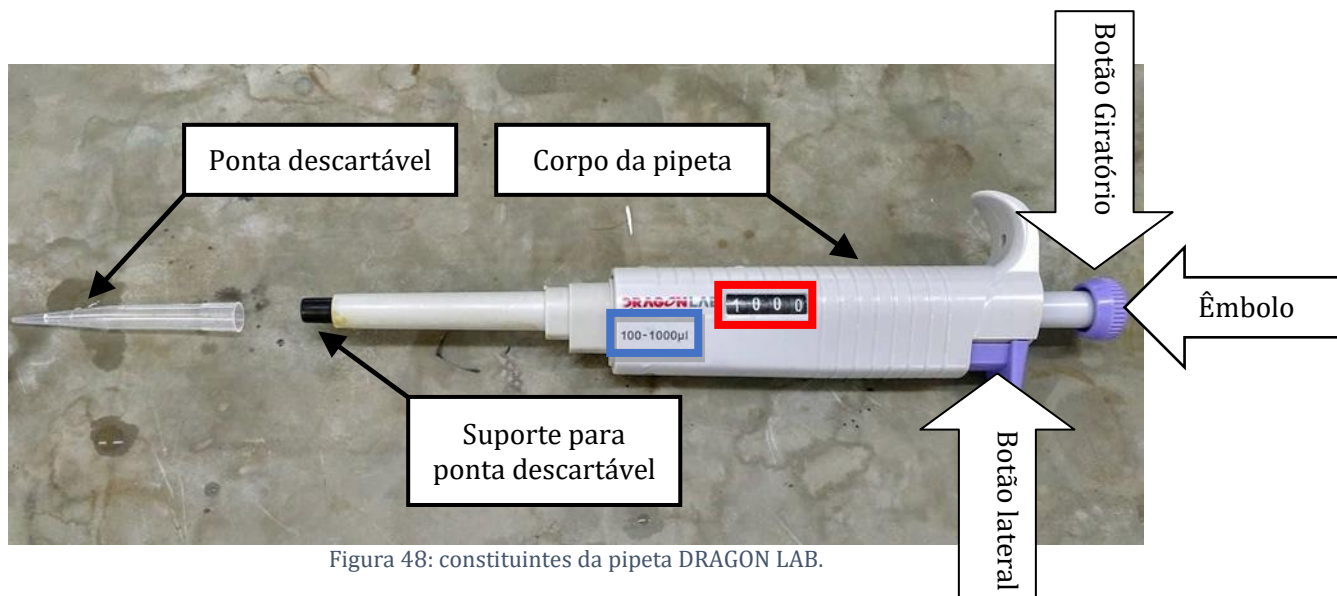


Figura 48: constituintes da pipeta DRAGON LAB.

As pipetas se encontram em suportes plásticos na bancada 5 (se necessário, consulte o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral**). Elas estão dispostas inclinadas verticalmente; desse modo, possíveis sujeiras provenientes de outras pipetagens não ficam acumuladas em seu interior (Figura 49). Após o uso da pipeta, é essencial que ela seja devolvida ao suporte.



Figura 49: suporte em que ficam dispostas as pipetas.

Cada pipeta apresenta um intervalo da quantidade de volume que suporta. O intervalo volumétrico está sinalizado no corpo da pipeta (retângulo azul na Figura 48), enquanto o leitor de volume sinaliza a quantidade que será pipetada (retângulo vermelho na Figura 48). É possível manipular o volume pipetado através do botão giratório (Figura 50). Por exemplo: a Figura 48 representa uma pipeta capaz de aspirar de 100 a 1000 μL (retângulo azul); o volume a ser pipetado aparece no leitor (retângulo vermelho) e possíveis manipulações do botão giratório alterariam esse valor. Deve-se pipetar somente volumes que estejam compreendidos dentro do intervalo volumétrico, respeitando o volume mínimo e o volume máximo indicados no corpo da pipeta. Caso o êmbolo seja girado para além do limite indicado, a mola existente dentro do aparelho ficará frouxa e não conseguirá mais exercer sua função.



Figura 50: ao rotacionar o botão giratório, o valor indicado no leitor volumétrico será alterado.

Para saber qual pipeta usar é necessário saber a equivalência entre mL e μL (Tabela 1). Basta lembrar que $1\text{ mL} = 10^{-3}\text{ L}$ e que $1\ \mu\text{L} = 10^{-6}\text{ L}$.

$$1 \cdot 10^{-6}\text{ L} \text{ — } 1\ \mu\text{L}$$

$$1 \cdot 10^{-3}\text{ L} \text{ — } x\ \mu\text{L} \quad \therefore \quad x = 1000\ \mu\text{L}$$

Logo, 1 mL corresponde a 1000 μL . Portanto, deve-se utilizar uma pipeta cujo intervalo compreenda o volume 1000 μL . Esta pipeta é a marcada com o rótulo “100 - 1000 μL ”.

Modelo de Pipeta	Volume Mínimo (μL)	Volume Máximo (μL)	Margem de volume recomendada (μL)
P-2	0,002	2	0,1 a 2
P-10	0,02	10	0,5 a 10
P-20	0,02	20	2 a 20
P-100	0,2	100	10 a 100
P-200	0,2	200	50 a 200
P-1000	2,0	1000	100 a 1000
P-5000	2,0	5000	500 a 5000

Tabela 1: equivalência entre o modelo das pipetas e os volumes que suportam.

6.2. Passo a passo

6.2.1. Segurar a pipeta com o polegar sobre o êmbolo e os demais dedos envolvendo a pipeta (Figura 51).



Figura 51: modo correto de se segurar a pipeta.

6.2.2. As pontas descartáveis estão acondicionadas em caixinhas em cima das bancadas do laboratório. Na tampa ou nas laterais de cada caixinha está especificado o volume que a ponta descartável é capaz de aspirar. O tamanho da ponta descartável vai ao encontro do intervalo volumétrico que a pipeta admite; logo, para uma pipeta de volume de 100 a 1000 μL , deve ser escolhida uma ponta descartável de 100 a 1000 μL . Para inserir a ponta descartável, deve-se pressionar o suporte para ponta descartável da pipeta (a parte preta, Figura 48) contra a ponta descartável na caixinha. Não tocar nas pontas descartáveis com os dedos, com ou sem luvas, pois outros experimentos podem exigir que elas estejam completamente limpas e, ao tocar em uma, poderá ocorrer a contaminação de outras pontas descartáveis (Figura 52).

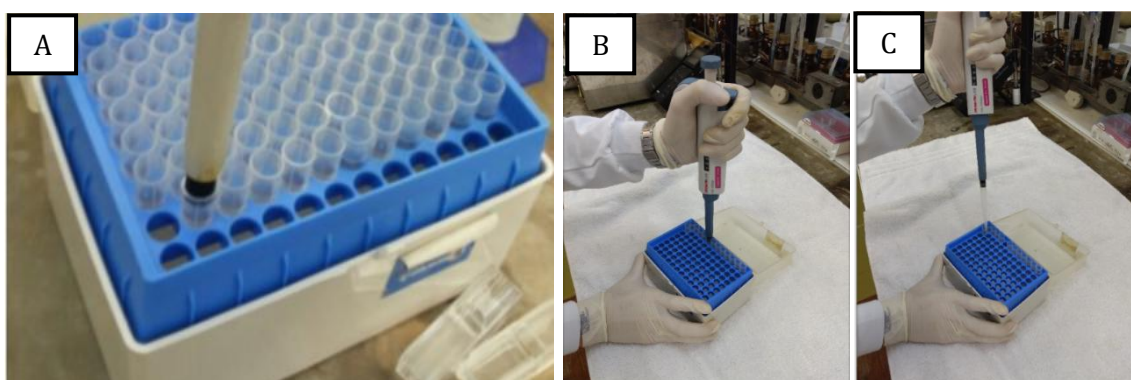


Figura 52: A: encaixando a ponta preta da pipeta diretamente na ponta descartável; B: pressionar a pipeta contra a ponta descartável; C: puxar o conjunto.

6.2.3. Antes de mergulhar a ponta descartável na solução, pressionar o êmbolo da pipeta até o **1º estágio** (Figura 53). Este é caracterizado enquanto o êmbolo estiver mole e ainda não oferecer maior resistência à pressão aplicada.



Figura 53: 1º estágio.

6.2.4. Ainda com o 1º estágio pressionado, mergulhar a ponta descartável na solução a pipetar e soltar o êmbolo **lentamente**. Do contrário, a solução será aspirada para dentro da pipeta, impossibilitando o descarte do volume correto de líquido e contaminando o interior do aparelho (este é um cuidado fundamental ao se trabalhar com peróxidos e complexos de ferro).

6.2.5. Direcionar a pipeta para onde se deseja liberar a solução (um béquer, por exemplo), como ilustra a Figura 54. Em seguida, pressionar o êmbolo até o final, ou seja, até o **2º estágio** (Figura 55). Este é caracterizado quando a mola estiver mais rígida, oferecendo maior resistência à pressão aplicada. Ao pressionar o botão até o 2º estágio, é fornecido um “sopro” extra que garante que toda a solução seja expelida da ponta descartável.

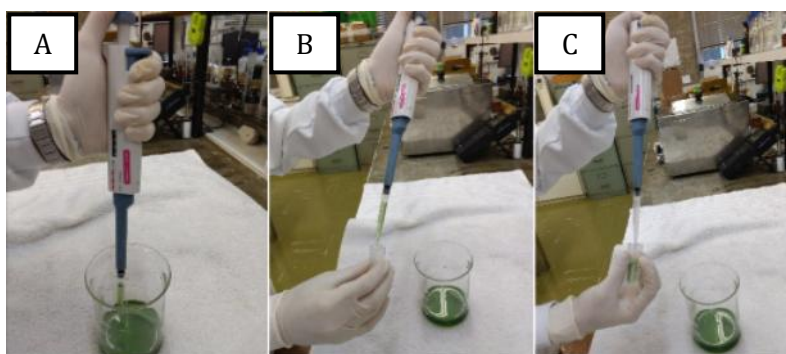


Figura 54: A: Direcionar o conjunto pipeta-ponta descartável para a solução a ser pipetada e pressionar seu êmbolo até o primeiro estágio; B: Levar o conjunto com a solução pipetada até o local de despejo; C: pressionar o segundo estágio.



Figura 55: 2º estágio.

6.2.6. Para descartar a ponta descartável, pressionar o botão lateral (Figura 56); ela sairá com algum impacto. O descarte da ponta descartável dependerá do trabalho que está sendo executado. Se existir a possibilidade de reutilização da ponta descartável, lavá-la na pia com detergente e água destilada e guardá-la na estufa para secagem (consultar o item **8. Limpeza das vidrarias**).



Figura 56: botão lateral.

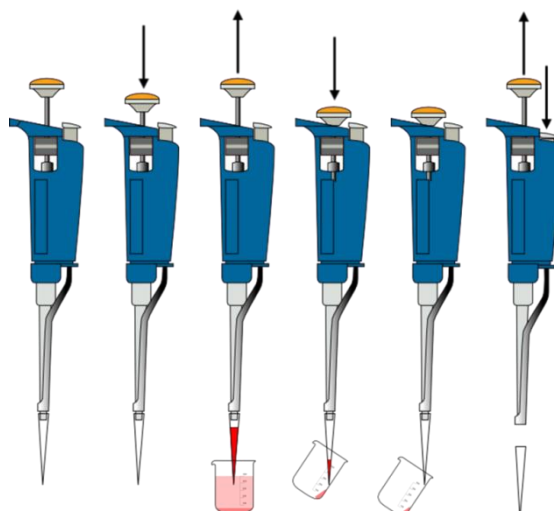


Figura 57: a sequência de passos descritos para a pipetagem está ilustrada nessa imagem. Fonte: <http://labiq.iq.usp.br> acessado em 10/02/18, sob autoria de Ana Carolina Moulatlet, do Laboratório Integrado de Química e Bioquímica (LABIQ) - USP, programa INOVA LAB 2012.

7. Espectrofotômetro Beckman Coulter DU 800

7.1. Informações gerais

A espectrofotometria é um método que estuda a interação da luz com a matéria e a partir desse princípio permite a realização de diversas análises (Figura 58). Cada composto químico absorve, transmite ou reflete luz ao longo de um determinado intervalo de comprimento de onda. A espectrofotometria pode ser utilizada para identificar e quantificar substâncias químicas a partir da medição da absorção e da transmissão de luz que passa através da amostra.

Como o espectrofotômetro funciona?

1. Uma amostra é colocada dentro do equipamento.
2. Há uma fonte de luz e um dispositivo, o monocromador, que divide a luz em cores, ou melhor, em comprimentos de onda específicos.
3. Uma fenda ajustável dentro do espectrofotômetro permite que apenas um comprimento de onda específico passe através da substância que se quer analisar.
4. Este comprimento de onda da luz atravessa a amostra, que está acondicionada em um pequeno recipiente chamado cubeta.
5. A luz passa através da amostra e é lida por um detector.
6. A leitura constará na tela do computador na forma de um gráfico cuja ordenada indica a absorbância e cuja abscissa indica o comprimento de onda.

O espectrofotômetro é muito sensível, portanto, qualquer interferência pode mostrar um resultado errado. Essa interferência pode ser luz exterior, falta de estabilidade do equipamento, cubeta riscada ou uma solução com outras substâncias.

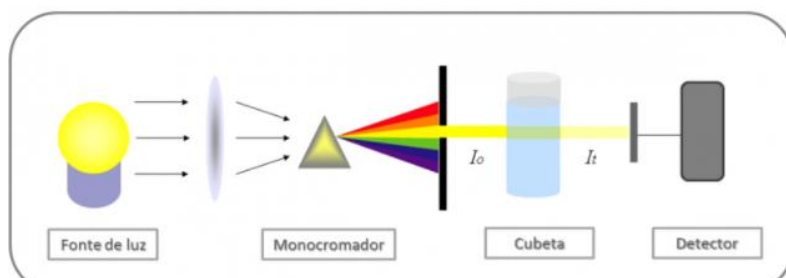


Figura 58: representação de um espectrofotômetro. Fonte: <http://www.gg.gg/boeuw>



Figura 59: vista frontal do espectrofotômetro Beckman Coulter DU-800 e do PC ao qual está acoplado.

O espectrofotômetro mais utilizado do Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral se localiza em uma sala próxima à bancada 6 (se necessário, consultar o item **1.4. Localização dos materiais básicos no Laboratório de Biomateriais e Bioquímica Oral**), Figura 59. As cubetas costumam estar em um pote de isopor, localizado na estufa de secagem ou ao lado do espectrofotômetro. Para a aferição da absorbância de soluções são utilizadas as cubetas de plástico (Figura 60).

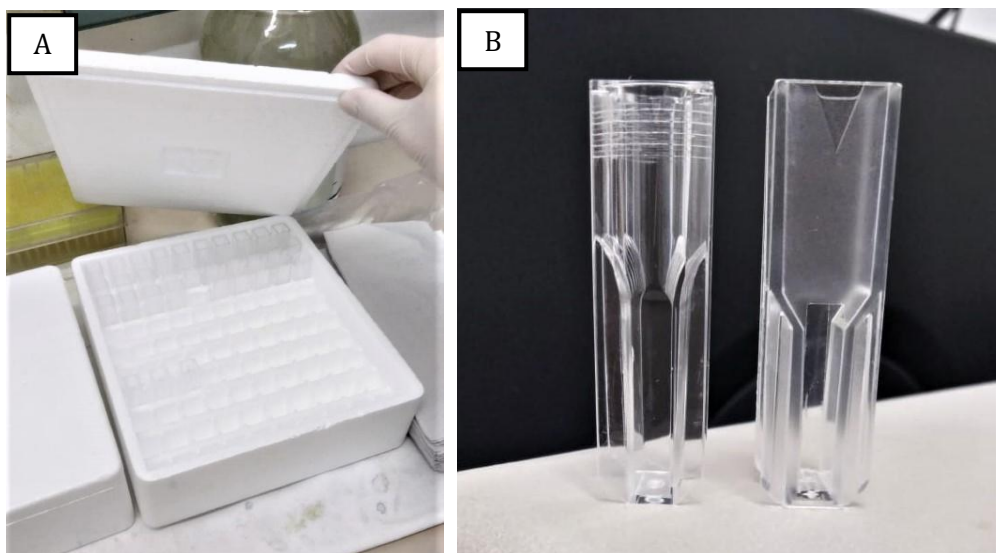


Figura 60: em A, a localização das cubetas; em B, as cubetas de plástico disponíveis.

A solução cuja absorbância se deseja aferir deverá ser pipetada dentro da cubeta de acordo com as instruções fornecidas no item **6. Pipeta DRAGON LAB TopPette**. Caso haja muitas cubetas para serem lidas, é possível transportá-las da bancada até a sala de espectrofotometria através do suporte (Figura 61).



Figura 61: suporte para as cubetas.

7.2. Passo a passo

7.2.1. Ligar o espectrofotômetro pressionando o botão verde do quadro de força do que se encontra na parede, logo atrás do aparelho. Além disso, a CPU ao lado do espectrofotômetro e o monitor deverão ser ligados em seus botões correspondentes, Figura 62.

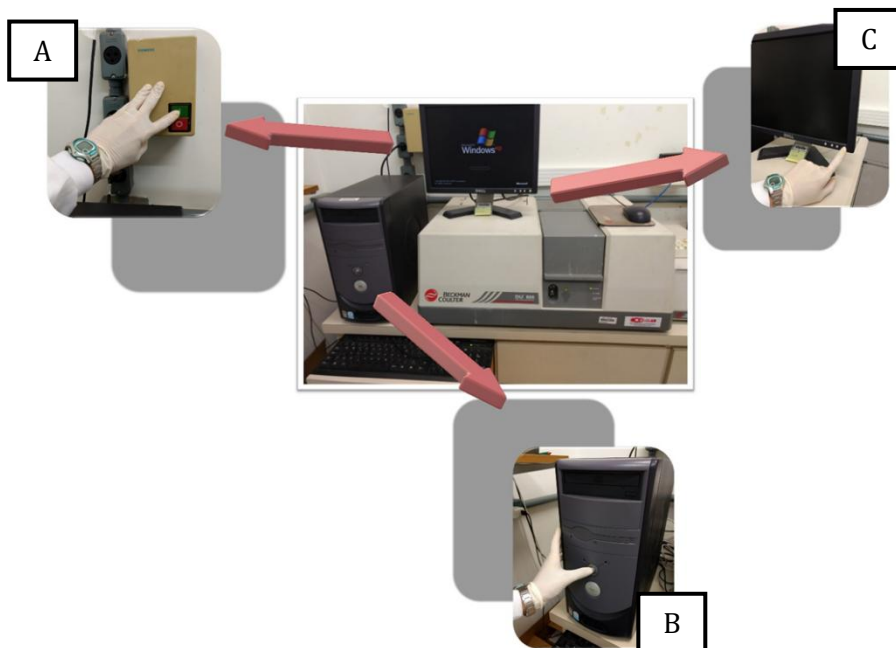


Figura 62: acionamento dos botões na seguintes ordem: botão verde do quadro de força (A), botão da CPU (B) e botão do monitor (C).

O espectrofotômetro indicará sua inicialização com o acendimento do LED verde em sua parte frontal, ao lado da palavra POWER. Os outros LEDs estarão habitualmente desligados, Figura 63.



Figura 63: led verde "POWER" indicando que o espectrofotômetro está ligado.

7.2.2. Após o completo carregamento do sistema operacional Windows XP, o usuário deverá dar um clique duplo no ícone "DU 800 Spectrophotometer", presente na área de trabalho (Figura 64).



Figura 64: programa DU 800 Spectrophotometer.

7.2.3. Após a abertura do software, o usuário deverá aguardar enquanto o programa verifica a presença de software atualizado, calibra o aparelho, inicializa os drives necessários para a leitura do espectrofotômetro e realiza os testes de avaliação do bom funcionamento do equipamento (Figura 65). Todo o processo poderá ser acompanhado pela janela de carregamento “DU 800 System Initialization”. Terminados os testes, o botão “Continue” estará disponível para ser pressionado. A janela DU 800 System Initialization desaparecerá (Figura 66).

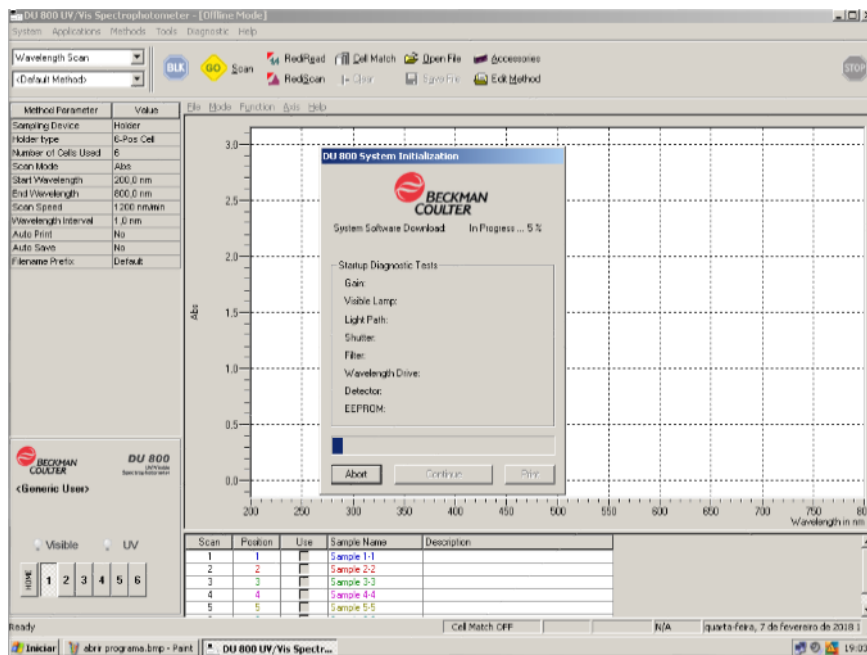


Figura 65: tela inicial do programa DU 800 Spectrophotometer, com a janela DU 800 System Initialization ao centro.

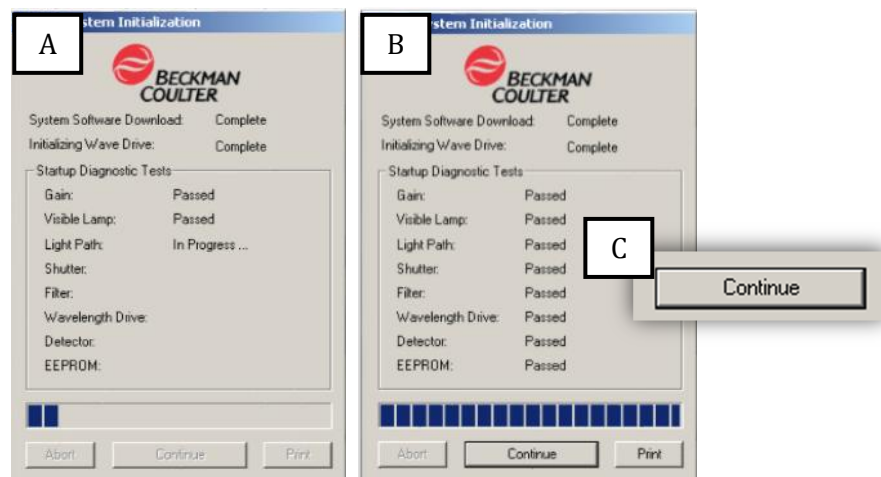


Figura 66: a janela DU 800 System Initialization durante a realização dos testes do espectrofotômetro. A barra azul de evolução do processo reiniciará diversas vezes. Ao final, quando todos os testes acusarem “Passed” (B), o botão Continue (C) estará disponível.

7.2.4. Em seguida, o usuário deverá ligar a lâmpada de tungstênio do espectrofotômetro correspondente à **luz visível**. Para isso, deve-se clicar no botão “Visible” no canto inferior esquerdo da tela. Ao ser clicado, o ícone “Visible” se tornará vermelho e o LED “TUNGSTEN LAMP” na região frontal do aparelho se acenderá (Figura 67).

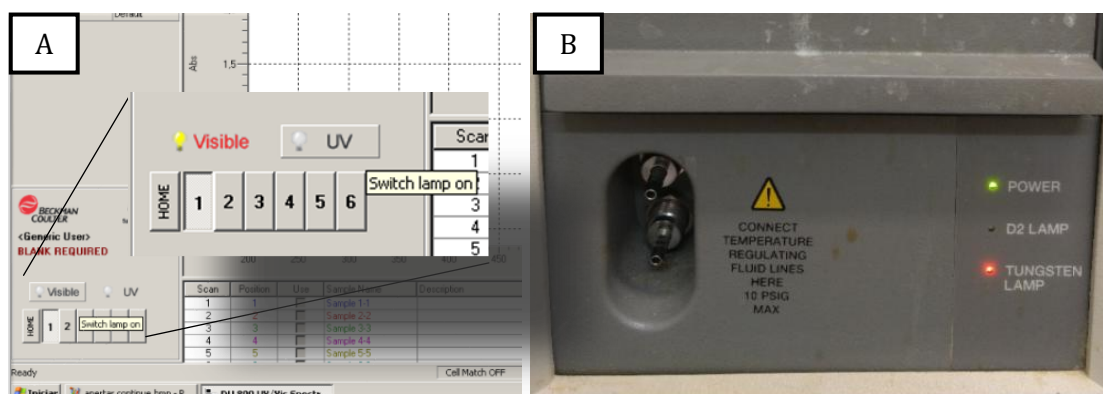


Figura 67: em A, botão “Visible” ligado; em B, LED “TUGNSTEN LAMP” aceso.

7.2.5. A lâmpada de deutério, correspondente à **luz UV**, também deverá ser ligada. Para isso, o usuário deve clicar no ícone “UV” no canto inferior esquerdo da tela. No entanto, a lâmpada UV demora de 30 a 60 segundos para aquecer e isso é indicado pela mensagem “Warming up UV Lamp” – enquanto essa mensagem não sumir, a lâmpada não poderá ser usada (Figura 68). Essa mensagem será substituída pela indicação do tempo de funcionamento da lâmpada (“UV Lamp On for 1 min 22 sec”) – quando essa mensagem aparecer, a lâmpada estará pronta para uso – e o ícone “UV” se tornará vermelho (Figura 69). Observar também, na parte frontal do espectrofotômetro, que o LED “D2 LAMP” se acenderá.

O aviso do tempo de funcionamento da lâmpada UV (“UV Lamp On for 1 min 22 sec”) se deve ao alto custo dessa lâmpada, que exige uma maior consciência durante seu uso.

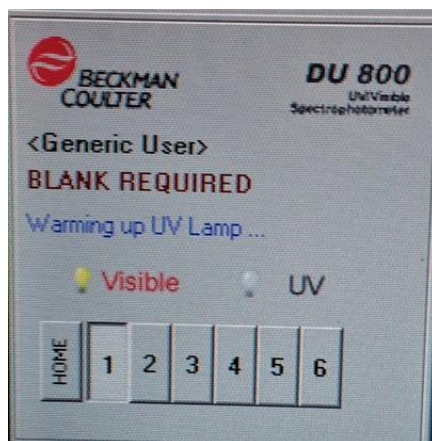


Figura 68: mensagem “Warming up UV Lamp” que aparece logo após o ícone “UV” ser pressionado.

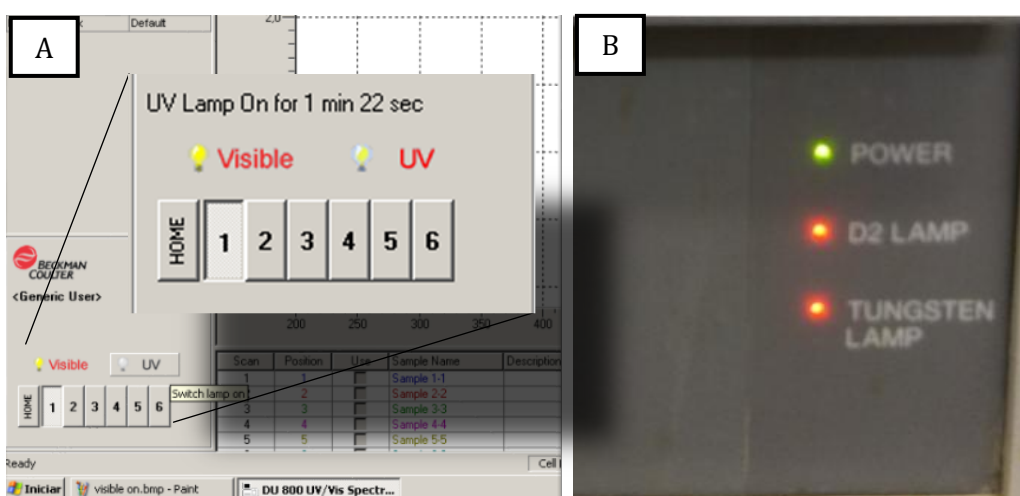


Figura 69: em A, botão UV ligado e lâmpada UV já aquecida, com a mensagem “UV Lamp On for 1 min 22 sec” indicando o seu tempo de funcionamento; em B, LED “D2 LAMP” aceso.

7.2.6. A seguir, os parâmetros para a leitura que se deseja realizar no espectrofotômetro devem ser determinados. Primeiro, no canto superior esquerdo da tela (Figura 70), deve-se clicar no retângulo superior e optar pelo modo de leitura “**Wavelength Scan**” (escaneamento de múltiplos comprimentos de onda). No retângulo inferior nada deve ser alterado, permanecendo na opção “<Default Method>”.

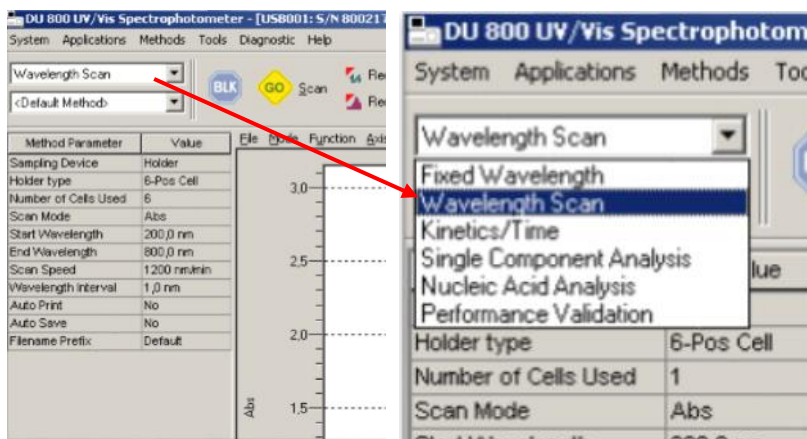


Figura 70: determinação do parâmetro de leitura “Wavelength Scan”.

7.2.7. No centro superior da tela, clicar em **“Edit Method”** (Figura 71). A janela **“Method for Wavelength Scan”** se abrirá no centro da tela.

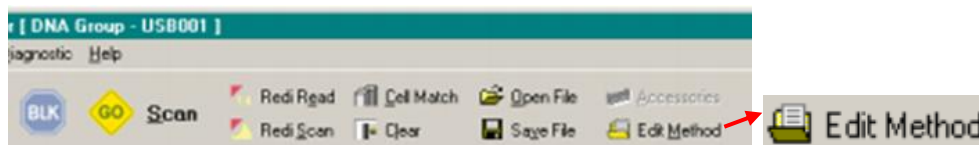


Figura 71: opção **“Create/Edit Method”**.

7.2.8. Na janela **“Method for Wavelength Scan”**, o usuário poderá determinar a forma de escaneamento (absorbância ou transmitância), o intervalo de comprimento de onda em que a amostra será lida, o número de amostras a serem escaneadas, entre outras particularidades. No entanto, para o experimento em questão, deve ser ajustado somente o número de amostras: na aba **“Sampler”**, selecionar o número de cubetas que serão lidas no espectrofotômetro através da opção **“Number of Cells Used”** (Figura 72).

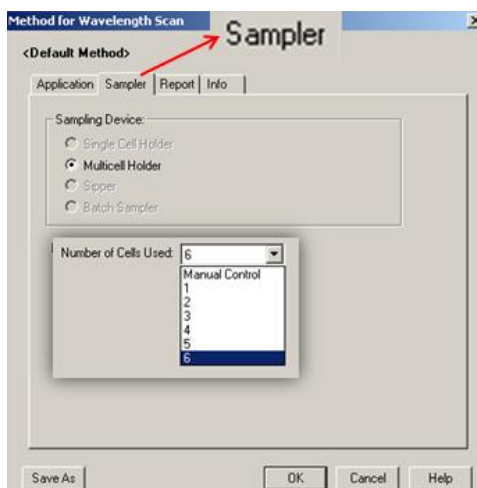


Figura 72: na aba **“Sampler”** da janela **“Method for Wavelength Scan”**.

7.2.9. Após a especificação da quantidade de amostras a serem lidas, um quadro surgirá na parte inferior da tela (Figura 73). Esse quadro mostra a quantidade de amostras selecionadas, suas posições no espectrofotômetro e seus nomes (Sample 1-1, Sample 2-2, Sample 3-3...). Os nomes das amostras devem ser redefinidos clicando-se sobre eles; isso deve ser feito antes da leitura do espectrofotômetro (depois não é mais possível a edição). Note que os nomes das amostras estão em cores diferentes – estas correspondem às cores dos gráficos de absorbância de cada amostra durante a leitura.

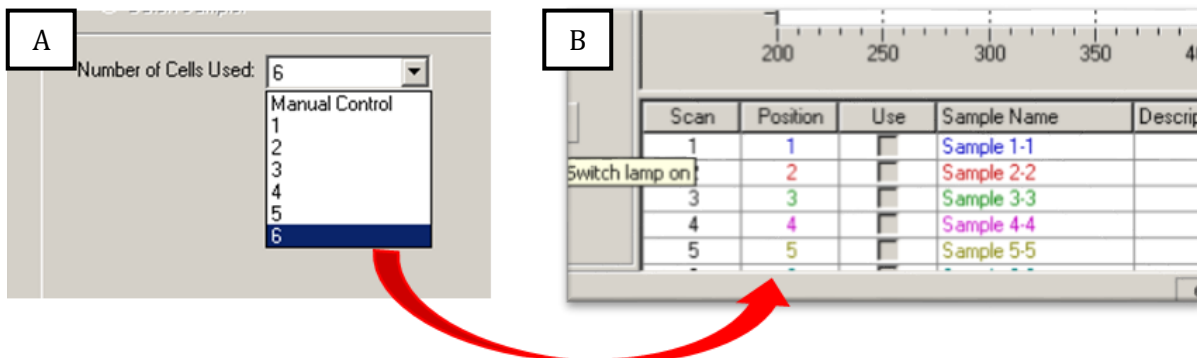


Figura 73: quadro que mostra a correspondência entre a janela (A) e a tela inicial (B) do programa referente ao número de amostras, suas posições, nomes e cores correspondentes.

7.2.10. Antes de realizar qualquer leitura no espectrofotômetro, deve-se realizar uma calibragem denominada “Blanking”, que consiste na leitura de uma cubeta contendo o solvente inerte (preferencialmente água deionizada) utilizado nas soluções que serão lidas posteriormente pelo espectrofotômetro. Para isso, deve-se pipetar em uma cubeta um volume de água deionizada equivalente ao volume das amostras que serão lidas – nesse experimento, 1 ml. Se necessário, consulte os itens **3. Preparo da solução** e **6. Pipeta DRAGON LAB TopPette**

7.2.11. Abrir a tampa do aparelho (Figura 74). Observar que há 6 nichos disponíveis; a cubeta com água deionizada deverá ser inserida no **primeiro espaço, aquele mais distante do usuário**, como apontado na Figura 75. Antes de inserir a cubeta, deve-se limpar a superfície externa com um tecido limpo. As cubetas têm papel fundamental e sua limpeza e correta utilização são essenciais para a obtenção de resultados corretos e confiáveis. Posicionar a cubeta de modo que o lado que apresenta uma seta (Figura 76) esteja voltado para o lado do espectrofotômetro – ou seja, para a esquerda do usuário –, tomando-se o cuidado de tocar somente em suas paredes laterais.

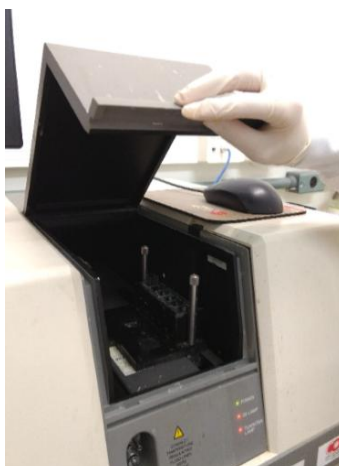


Figura 74: tampa do espectrofotômetro sendo aberta.

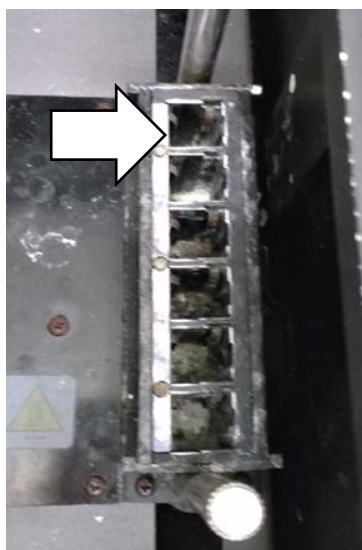


Figura 75: posição em que a cubeta do branco deverá ser inserida.

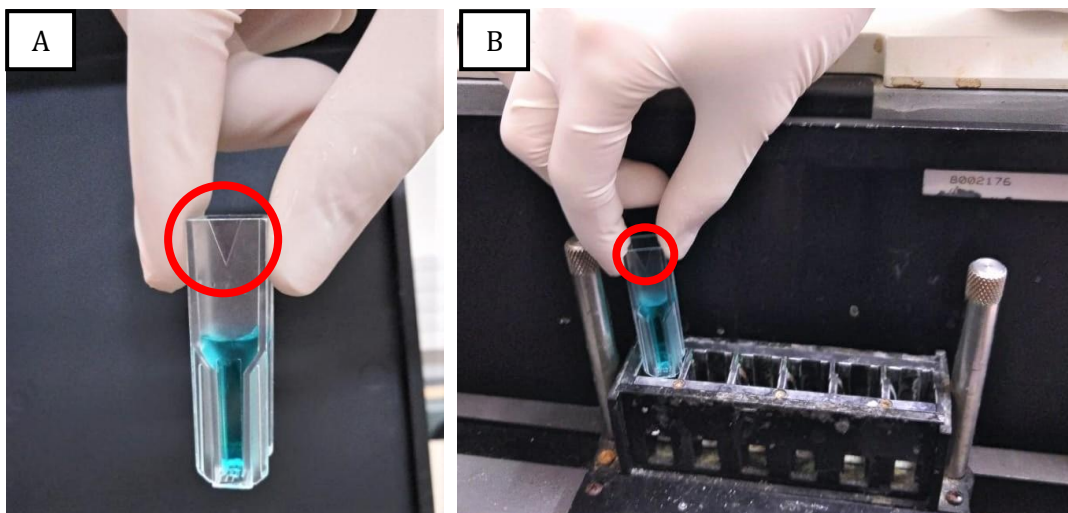


Figura 76: ênfase (círculo vermelho) na seta presente na superfície da cubeta. Em B, a cubeta é posicionada no espectrofotômetro tocando-se apenas em suas paredes laterais.

7.2.12. Em seguida, fechar a tampa do aparelho e clicar no ícone **“BLK”** na parte superior da tela. O programa indicará que o procedimento está sendo realizado com o aparecimento da mensagem **“Blanking...”** no lugar de **“Blank Required”**, no canto esquerdo inferior. Quando o processo for concluído, a mensagem **“Blanking...”** será substituída por **“Last Blanked at...”** e o horário de quando o procedimento foi finalizado. Com isso, o usuário poderá prosseguir para o próximo passo (Figura 77).

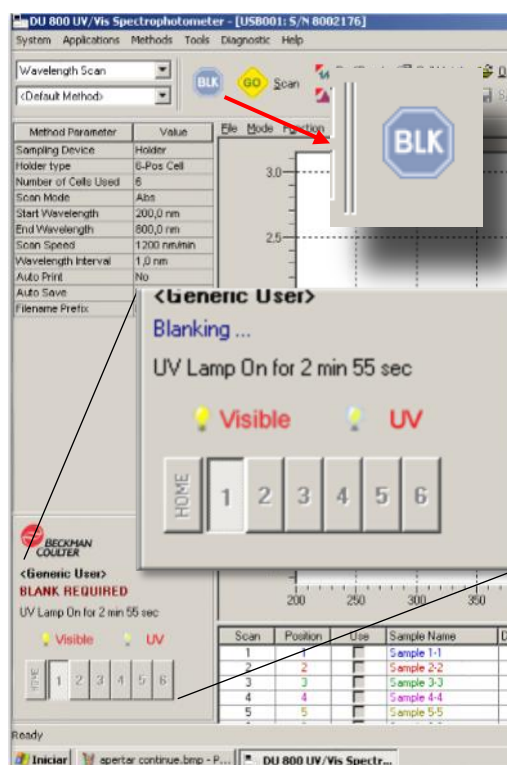


Figura 77: ao se clicar no ícone **“BLK”**, a mensagem **“BLANK REQUIRED”** será alterada para **“Blanking...”**. Deve-se aguardar até que a mensagem **“Last Blanked at...”** apareça.

7.2.13. Terminada a calibragem, chega o momento de realizar a leitura das absorvâncias das soluções desejadas. Atenção: antes de inserir cada cubeta, deve-se limpar a superfície externa com um tecido limpo e posicioná-la de modo que o

lado da cubeta que apresenta uma seta esteja voltado para o lado do espectrofotômetro – ou seja, para a esquerda do usuário –, tomando-se o cuidado de tocar somente em suas paredes laterais (Figura 76). Além disso, deve-se ter o cuidado de **posicionar cada cubeta no espaço correspondente à amostra nomeada no programa**. Para compreender melhor, ler o quadro abaixo e observar a Figura 78 e a Figura 79.

O primeiro espaço no espectrofotômetro (aquele mais distante do usuário) corresponde à Sample 1-1 no programa; o segundo, à Sample 2-2; e assim por diante. Logo, a ordem em que as cubetas estão posicionadas é fundamental. Por exemplo: se a Sample 1-1 foi nomeada como “Tartrazina 0,001%”, deve-se certificar de que a cubeta contendo essa solução esteja encaixada no primeiro espaço do espectrofotômetro.

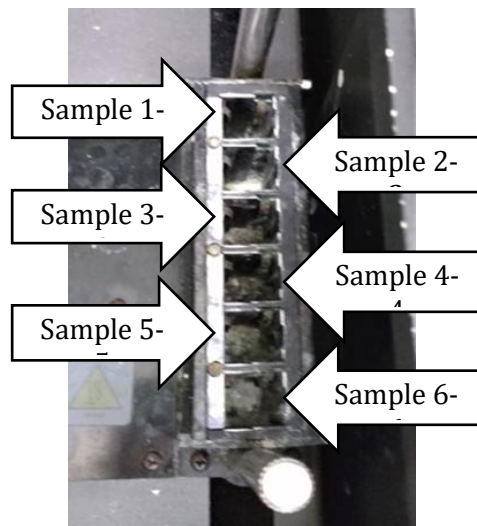


Figura 78: correspondência entre os espaços no espectrofotômetro e os nomes das amostras no programa.

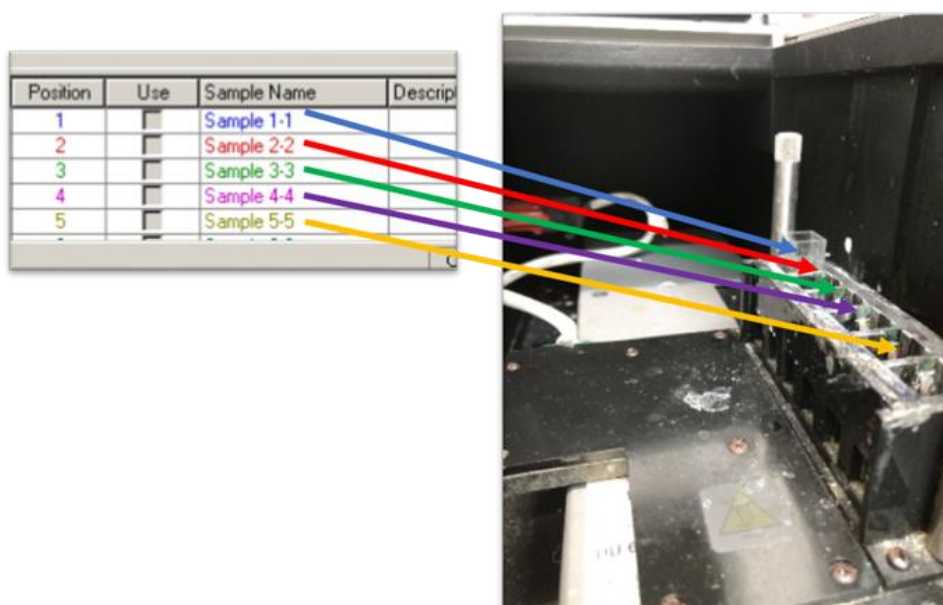


Figura 79: correspondência entre os espaços no espectrofotômetro e os nomes das amostras no programa.

7.2.14. Com as cubetas posicionadas e a tampa fechada, clicar no ícone **“GO Scan”** no centro superior da tela para iniciar a leitura das amostras. Enquanto o processo estiver em andamento, os botões abaixo da barra de ferramentas se tornarão cinzas (inacessíveis), como mostra a Figura 80. O processo estará encerrado quando os botões voltarem ao colorido e os gráficos estiverem concluídos, Figura 81.

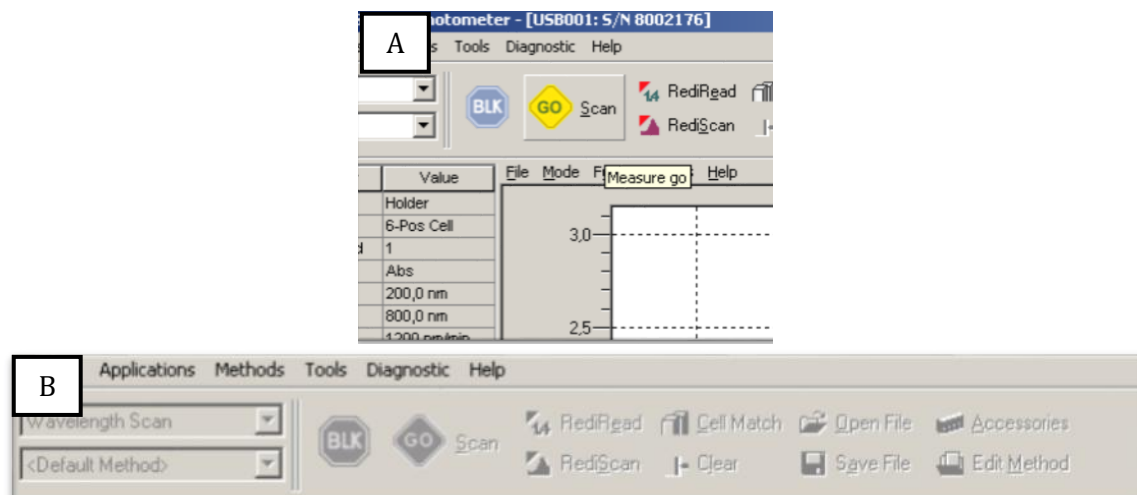


Figura 80: em A o ícone **“GO Scan”**; ao ser pressionado, os botões abaixo da barra de ferramentas se tornarão cinzas (B) e voltarão ao colorido somente ao final da leitura.

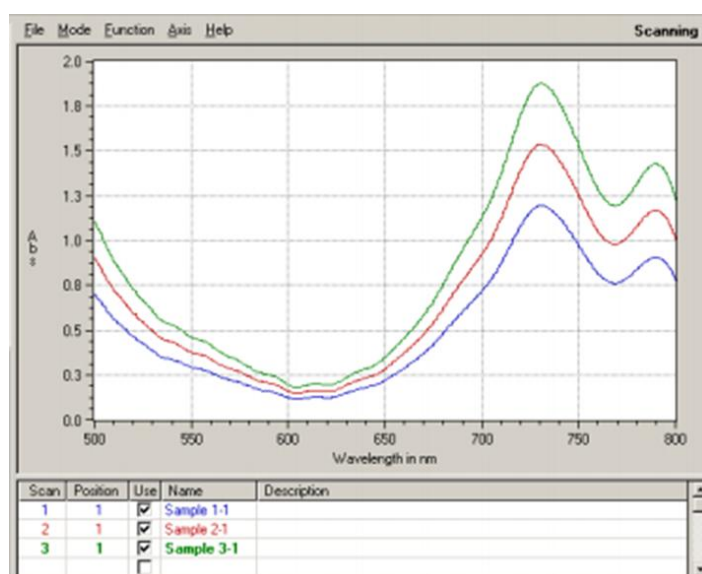


Figura 81: exemplos de gráficos obtidos para diferentes amostras. Observar que a cor do nome de cada amostra corresponde à cor de seu gráfico.

7.2.15. Ao fim da leitura, selecione a(s) curva(s) que se deseja salvar clicando no quadrado ao lado de seu nome, na coluna **“Use”** (Figura 81). Em **“File”**, selecionar a opção **“Save Marked Scans”** (Figura 82). Salve-a(s) na subpasta individual, na pasta com o nome do responsável pela pesquisa ou orientador. Essa opção salvará o arquivo em um formato que só poderá ser lido no próprio programa DU 800 Spectrophotometer – ele é útil para consultar posteriormente os gráficos obtidos.

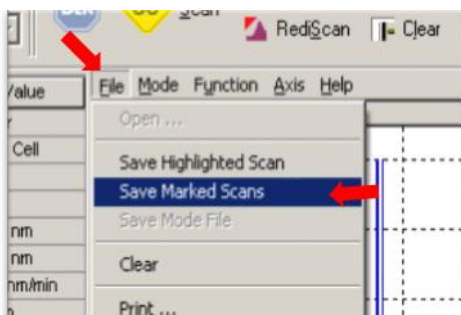


Figura 82: a opção "Save Marked Scans".

7.2.16. No centro superior da tela, clicar no ícone "Clear". Os gráficos desaparecerão da tela, Figura 83.

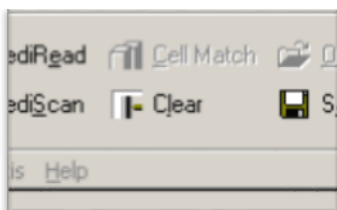


Figura 83: ícone "Clear".

7.2.17. Após ter dado "Clear", apagar as luzes visível e UV clicando em seus ícones correspondentes, se não desejar realizar a aferição de outras soluções (neste caso, apenas insira as novas soluções e repita o procedimento). Perceba que os ícones se tornarão cinzas e que, na parte frontal do espectrofotômetro, os LEDs "D2 LAMP" e "TUNGSTEN LAMP" se apagarão (Figura 84).

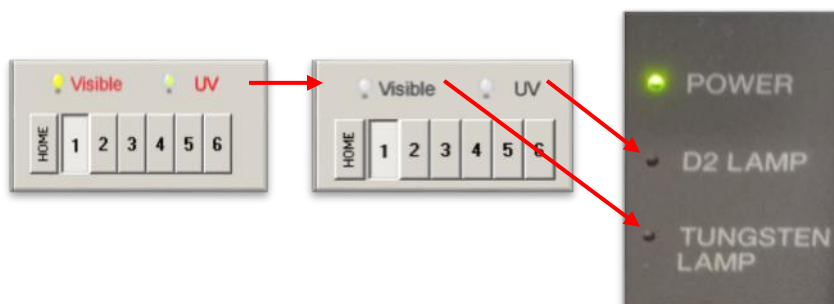


Figura 84: desligamento das lâmpadas.

7.2.18. Para abrir os dados da curva obtida em outros computadores que não possuam o software do espectrofotômetro, é possível salvá-los no formato "csv", compatível com o Excel. Para isso, clique no ícone "Open File" no centro superior da tela (Figura 85) e selecione o arquivo que foi salvo anteriormente no item 7.2.15.

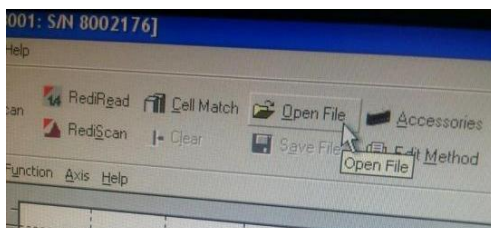


Figura 85: ícone "Open File".

7.2.19. Com a curva aberta, clique em **“Tools”** na barra de ferramentas e selecione a opção **“Data Export”** (Figura 86). Novamente, salve os dados na subpasta individual, na pasta com o nome do responsável pela pesquisa ou orientador.

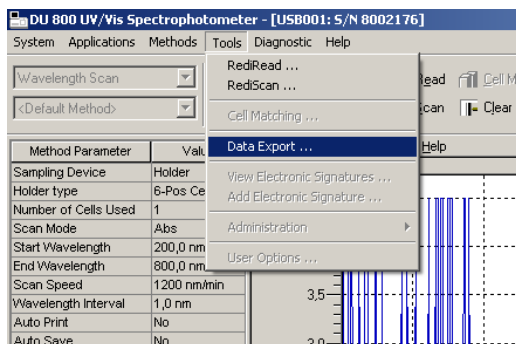


Figura 86: opção “Data Export”, em “Tools”.

7.2.20. Caso o usuário deseje imprimir as curvas, a curva deve estar aberta no programa (como instruído no item 7.2.18). Em seguida, deve-se clicar em **“File”** e selecionar a opção **“Print”** (Figura 87).

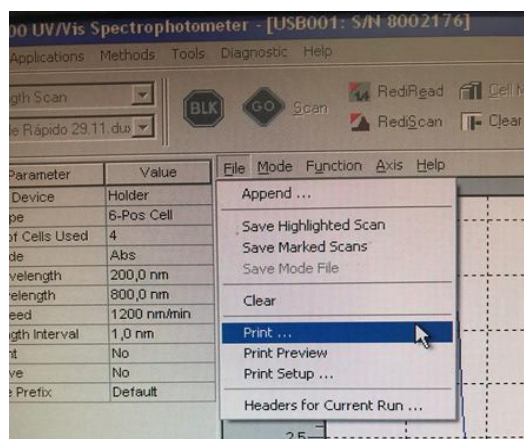


Figura 87: opção “Print”, em “File”.

7.2.21. Para sair do programa, clicar em **“Clear”** (Figura 83). Em seguida, fechar a janela do programa e desligar o computador. Com o computador totalmente desligado, deve-se pressionar o botão vermelho do quadro de força que se encontra na parede, logo atrás do aparelho (Figura 88). Notar que todos os LEDs na parte frontal do espectrofotômetro estão apagados (Figura 89).



Figura 88: primeiro, deve-se desligar o computador (A) para, em seguida, desligar o espectrofotômetro no quadro de força (B).



Figura 89: observar todos os LEDs apagados na parte frontal do aparelho.

7.2.22. Abrir a tampa do aparelho, retirar as cubetas e higienizá-las (consultar o item 8. **Limpeza das vidrarias**).

8. Limpeza das vidrarias

Entre as bancadas de número 3 e 4 está localizada a pia para a lavagem dos materiais do laboratório. Ali se encontram a esponja, o detergente, as escovas cilíndricas, a toalha e o galão de água destilada (Figura 90).

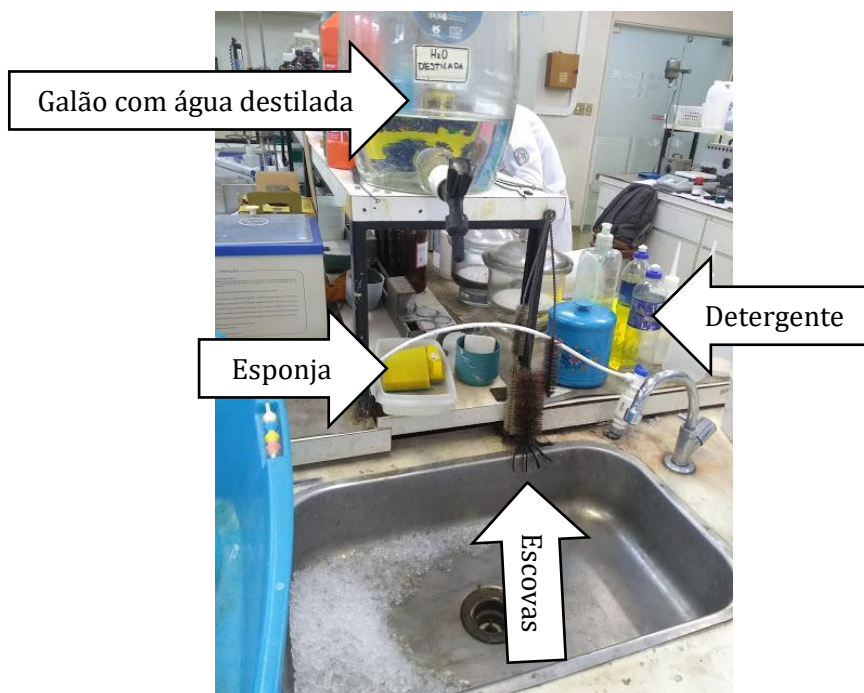


Figura 90: pia do laboratório com os utensílios necessários para a lavagem das vidrarias.

À frente da pia está localizada a estufa para secagem e esterilização. Ela deve ser aberta puxando a porta pelo canto superior esquerdo, como ilustra a Figura 91. Esse movimento deve ser feito com força, pois a porta oferece certa resistência.

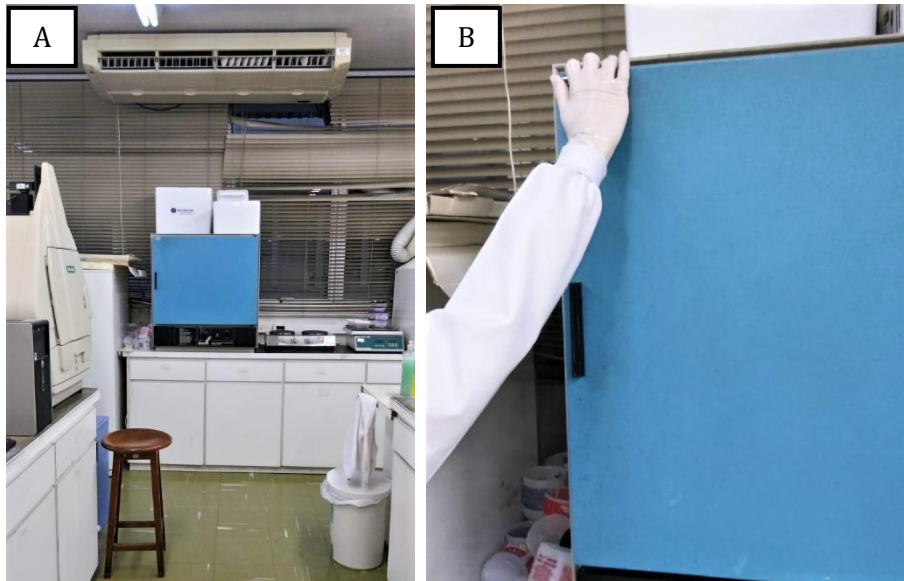


Figura 91: em A, a localização da estufa para secagem e esterilização das vidrarias; em B, o modo correto de abri-la.

Na pia, todas as vidrarias devem ser lavadas com água da torneira, esfregando cuidadosamente suas superfícies internas e externas com esponja e detergente. Para objetos estreitos, como balões volumétricos e cubetas, deve-se utilizar uma escova de diâmetro adequado para atingir a base da vidraria (Figura 92).

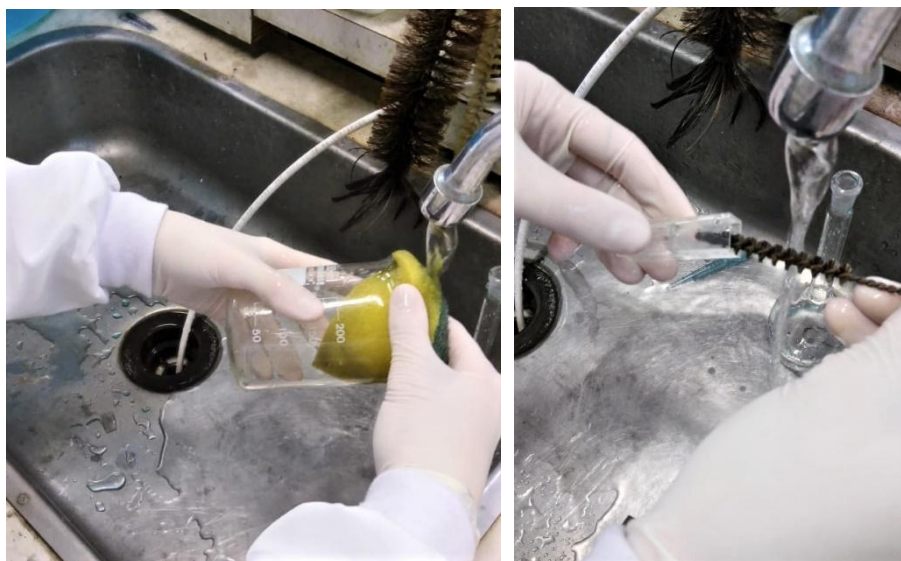


Figura 92: exemplos de lavagem de vidrarias utilizando esponja e escovas.

Após a lavagem, enxaguar o interior das vidrarias com água destilada retirada do galão (Figura 93).



Figura 93: enxague das vidrarias em água destilada.

Escorrer o excesso de água e, em seguida, depositar o a vidraria na estufa com a sua abertura virada para baixo (Figura 94).



Figura 94: vidraria sendo colocada na estufa.

Antes de deixar o laboratório, deve-se fazer uma vistoria pelas bancadas e equipamentos utilizados, conferindo a higienização dos utensílios, o adequado desligamento dos aparelhos e a organização do espaço.

9. Índice de Imagens

Figura 1: vista geral do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral.	7
Figura 2: materiais básicos.....	8
Figura 3: numeração das bancadas.	9
Figura 4: armário de béqueres (A) e os béqueres (B).....	9
Figura 5: armário de balões volumétricos (A) e balões volumétricos (B).	10
Figura 6: gaveta das barras magnéticas (à esquerda) e vista superior da gaveta, com ênfase nas barras magnéticas (retângulo vermelho à direita).	10
Figura 7: equipamento de produção de água deionizada. Para usá-lo, pressionar o local indicado com o polegar para que se inicie a liberação da água. Pressionar novamente para cessar a saída de água.	10
Figura 8: balança analítica.....	11
Figura 9: exemplo de espátula disponível para uso.	12
Figura 10: exemplos de recipiente plástico (A) e papel de seda (B) disponíveis.....	12
Figura 11: pincel disponível.....	12
Figura 12: materiais separados sobre a bancada onde se encontra a balança analítica.	13
Figura 13: passo a passo da dobradura do papel de seda.	13
Figura 14: A: o botão a ser pressionado. B: a balança ligada e com o painel aceso.....	13
Figura 15: passo a passo da inserção do papel de seda sobre o prato da balança.	14
Figura 16: símbolo * ao canto esquerdo do painel.	14
Figura 17: sequência que ilustra o como tarar a balança analítica. A: o painel mostra uma medida estabilizada e o botão “→0/T←” está sendo pressionado. B: o peso do painel está zerado.	14
Figura 18: sequência que ilustra o material sendo retirado com a espátula e depositado sobre o papel de seda. A: amostra da substância a ser pesada; B: inserindo cuidadosamente a amostra no papel de seda já posto na balança; C: a pesagem será iniciada; D: fechamento da porta da balança.....	15
Figura 19: botão “Mode OFF” sendo pressionado”.....	15
Figura 20: A: limpeza da balança com o pincel; B: limpeza da balança com papel absorvente úmido.	16
Figura 21: equipamento de água deionizada. O botão “SIM” (círculo em A) deve ser pressionado para a saída da água. A posição em que o béquer deve ser mantido está ilustrada em B.	18
Figura 22: A: água sendo transferida do béquer para o balão volumétrico. B: balão volumétrico preenchido em vista frontal. C: marcação que deve ser atingida (menisco) ao preencher o balão volumétrico.	18
Figura 23: : sequência que ilustra a transferência do material em pó no béquer, de modo que este seja diluído no volume de água previamente medido no balão.	19
Figura 24: em A, a solução sendo pipetada na água contida no balão volumétrico. Em B, a solução sendo homogeneizada.....	19
Figura 25: agitador magnético MICON (vista frontal).....	20
Figura 26: em A, o “peixinho” de tamanho inadequado, com comprimento maior que o diâmetro do béquer, encostando em uma das paredes laterais do béquer. Em B, o peixinho de tamanho correto, posicionado no fundo do béquer sem encostar nas paredes laterais do béquer.	21
Figura 27: ao iniciar a rotação do botão em sentido horário, o usuário perceberá um “clique” e o acendimento da luz vermelha em cima do botão, indicando que o aparelho foi ligado.....	21
Figura 28: agitador magnético ETICA (vista frontal).	22
Figura 29: em A, o botão verde sendo pressionado; em B, o botão verde aceso e o botão preto sendo girado.	23
Figura 30: pHmetro KASVI (vista frontal) e materiais essenciais para seu uso.	24
Figura 31: em A, vista posterior do pHmetro KASVI; em B, o botão On/Off.	24
Figura 32: sequência que ilustra a mudança de mV para pH.....	25
Figura 33: sequência de retirada da capa de proteção que protege o eletrodo.....	25
Figura 34: sequência de retirada do eletrodo do suporte.	25
Figura 35: em A, detalhe da ponta do eletrodo; em B, a lavagem da ponta do eletrodo.....	26
Figura 36: secagem da ponta do eletrodo no pedaço de papel higiênico.	26
Figura 37: em A, a localização das soluções padrão na bancada (retângulo vermelho); em B, a ponta do eletrodo imersa no frasco de pH = 7.	27

Figura 38: o botão Std é composto por duas setas (A); após uma delas ser pressionada, a mensagem “Std YES” aparece no visor (B).	27
Figura 39: botão “Enter” sendo pressionado.	28
Figura 40: setas do botão “Std” sendo pressionadas até que o visor apresente o pH 7 (C) correspondente à solução padrão.	28
Figura 41: ao mesmo tempo em que a ponta do eletrodo está totalmente submersa na solução, há uma distância segura entre ela e o “peixinho” em agitação (seta). Reparar também que o eletrodo está preso no braço do pHmetro (observação: esse é o eletrodo do pHmetro Sartorius).....	29
Figura 42: pHmetro Sartorius (vista frontal) e materiais essenciais para seu uso.....	30
Figura 43: em A, o eletrodo sendo retirado da capa de proteção; em B, a capa de proteção retida no suporte; em C, a lavagem da ponta do eletrodo.	30
Figura 44: ponta do eletrodo sendo inserida na solução padrão de pH = 7.	31
Figura 45: estabilização da leitura de pH da solução padrão, com surgimento do símbolo “S” no visor..	31
Figura 46: o botão “Standardize” sendo pressionado para calibrar o aparelho com o valor obtido na leitura da solução padrão.....	32
Figura 47: ao mesmo tempo em que a ponta do eletrodo está totalmente submersa na solução, há uma distância segura entre ela e o “peixinho” em agitação (seta). Reparar também que o eletrodo está preso no braço do pHmetro.	33
Figura 48: constituintes da pipeta DRAGON LAB.....	34
Figura 49: suporte em que ficam dispostas as pipetas.	34
Figura 50: ao rotacionar o botão giratório, o valor indicado no leitor volumétrico será alterado.	35
Figura 51: modo correto de se segurar a pipeta.	36
Figura 52: sequência de encaixe da ponta descartável na pipeta.	36
Figura 53: 1º estágio.	37
Figura 54: 2º estágio.	38
Figura 55: sequência de imagens que ilustra os procedimentos dos itens 4 e 5.....	37
Figura 56: botão lateral.....	38
Figura 57: a sequência de passos descritos para a pipetagem está ilustrada nessa imagem.	38
Figura 58: representação de um espectrofotômetro.....	39
Figura 59: vista frontal do espectrofotômetro Beckman Coulter DU-800 e do PC ao qual está acoplado.	39
Figura 60: em A, a localização das cubetas; em B, as cubetas de plástico disponíveis.	40
Figura 61: suporte para as cubetas.....	40
Figura 62: acionamento dos botões na seguintes ordem: botão verde do quadro de força (A), botão da CPU (B) e botão do monitor (C).....	41
Figura 63: led verde “POWER” indicando que o espectrofotômetro está ligado.	41
Figura 64: programa DU 800 Spectrophotometer.....	42
Figura 65: tela inicial do programa DU 800 Spectrophotometer, com a janela DU 800 System Initialization ao centro.	42
Figura 66: a janela DU 800 System Initialization durante a realização dos testes do espectrofotômetro. A barra azul de evolução do processo reiniciará diversas vezes. Ao final, quando todos os testes acusarem “Passed” (B), o botão Continue (C) estará disponível.	43
Figura 67: em A, botão “Visible” ligado; em B, LED “TUGNSTEN LAMP” aceso.	43
Figura 68: mensagem “Warming up UV Lamp” que aparece logo após o ícone “UV” ser pressionado.	44
Figura 69: em A, botão UV ligado e lâmpada UV já aquecida, com a mensagem “UV Lamp On for 1 min 22 sec” indicando o seu tempo de funcionamento; em B, LED “D2 LAMP” aceso.	44
Figura 70: determinação do parâmetro de leitura “Wavelength Scan”.....	44
Figura 71: opção “Create/Edit Method”.	45
Figura 72: na aba “Sampler” da janela “Method for Wavelength Scan”	45
Figura 73: quadro que mostra a correspondência entre a janela (A) e a tela inicial (B) do programa referente ao número de amostras, suas posições, nomes e cores correspondentes.	45
Figura 74: tampa do espectrofotômetro sendo aberta.	46
Figura 75: posição em que a cubeta do branco deverá ser inserida.	46
Figura 76: ênfase (círculo vermelho) na seta presente na superfície da cubeta. Em B, a cubeta é posicionada no espectrofotômetro tocando-se apenas em suas paredes laterais.....	47

Figura 77: ao se clicar no ícone “BLK”, a mensagem “BLANK REQUIRED” será alterada para “Blanking..”. Deve-se aguardar até que a mensagem “Last Blanked at..” apareça.	47
Figura 78: correspondência entre os espaços no espectrofotômetro e os nomes das amostras no programa.	48
Figura 79: correspondência entre os espaços no espectrofotômetro e os nomes das amostras no programa.	48
Figura 80: em A o ícone “GO Scan”; ao ser pressionado, os botões abaixo da barra de ferramentas se tornarão cinzas (B) e voltarão ao colorido somente ao final da leitura.	49
Figura 81: exemplos de gráficos obtidos para diferentes amostras. Observar que a cor do nome de cada amostra corresponde à cor de seu gráfico.	49
Figura 82: a opção “Save Marked Scans”.....	50
Figura 83: ícone “Clear”.....	50
Figura 84: desligamento das lâmpadas.....	50
Figura 85: ícone “Open File”.....	50
Figura 86: opção “Data Export”, em “Tools”.....	51
Figura 87: opção “Print”, em “File”.....	51
Figura 88: primeiro, deve-se desligar o computador (A) para, em seguida, desligar o espectrofotômetro no quadro de força (B).....	51
Figura 89: observar todos os LEDs apagados na parte frontal do aparelho.	52
Figura 90: pia do laboratório com os utensílios necessários para a lavagem das vidrarias.	52
Figura 91: em A, a localização da estufa para secagem e esterilização das vidrarias; em B, o modo correto de abri-la.	53
Figura 92: exemplos de lavagem de vidrarias utilizando esponja e escovas.	53
Figura 93: enxague das vidrarias em água destilada.	54
Figura 94: vidraria sendo colocada na estufa.	54

10. Referências

1. Harris, D.C., *Quantitative chemical analysis*. 6th ed. 2003, New York: W.H. Freeman.