

67

**Circular
Técnica**

*Brasília, DF
Dezembro 2007*

Autor

PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

José Cesamildo Cruz Magalhães
Letras, B.Sc, Assistente,
Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Marise Ventura Coutinho
Engenheiro Agrônoma, M.Sc.,
Pesquisadora, Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia





Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

SUMÁRIO

1	CAMPO DE APLICAÇÃO	3
2	DEFINIÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS	3
	Definições.....	3
	Siglas e abreviaturas	3
3	RESPONSABILIDADES	3
4	DESCRIÇÃO	4
	Especificação do equipamento.....	4
	Manutenção.....	6
	Manutenção.....	7
	Verificação/Calibração.....	8
5	ANEXOS	10
6	REFERÊNCIAS.....	10
	Complementares	10

	Data	Nome	Assinatura
Elaboração	16/11/06	José Cesamildo Cruz Magalhães	
Verificação	16/11/06	Marise Ventura Coutinho	
Aprovação	16/11/06	Mauro Carneiro	



Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

OBJETIVO

É objetivo deste procedimento estabelecer critérios para operação, manutenção e verificação de espectrofotômetro.

1 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este procedimento aplica-se à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Cruzadas

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Lista mestra de documentos do Sistema da Qualidade (038.10.02.00.6.001)**. Revisão 000. Brasília, 2006. 42 p.

2 DEFINIÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS.

Definições

Este item não aplica-se ao documento.

Siglas e abreviaturas

DNA ácido desoxirribonucléico

STD standard (padrão)

3 RESPONSABILIDADES

	Data	Nome	Assinatura
Elaboração	16/11/06	José Cesamildo Cruz Magalhães	
Verificação	16/11/06	Marise Ventura Coutinho	
Aprovação	16/11/06	Mauro Carneiro	



Código
038.11.04.10.4.004

Revisão
000

Cópia
Não-Controlada

Página
4/11

Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

Pesquisadores, analistas, assistentes e colaboradores.

4 DESCRIÇÃO

Especificação do equipamento

Fotômetro

- a) **sistema óptico:** fotômetro monoespectral de absorção com feixe luminoso de referência e vários comprimentos de onda fixados;
- b) **fonte de luz:** lâmpada de xenon;
- c) **comprimentos de onda:** Xe (230; 260; 280; 320; 562; 595) nm;
- d) **seleção do comprimento de onda:** dependente do método e controlada pelos programas;
- e) **largura da banda espectral:** 5 nm: (230 até 320) nm; 7 nm: (562 até 595) nm;
- f) **faixa de medição fotométrica:**
 - cuvetas de quartzo: 0,000 até 3,000 A;
 - Uvette® (Eppendorf): 2,5 A a 230 nm, 2,6 A a 260 nm, 2,8 A a 280 nm, 2,9 A a 320 nm.
- g) **inexatidão do comprimento de onda:** ± 1 nm: (230 até 280) nm; ± 2 nm: (320 até 595) nm;
- h) **inexatidão fotométrica:** $\pm 1\%$ a 1 A;
- i) **imprecisão fotométrica:** $\leq 0,002$ A a 0 A; $\leq 0,005$ A a 1 A;
- j) **exatidão de leitura:** 0,001 A;

	Data	Nome	Assinatura
Elaboração	16/11/06	José Cesamildo Cruz Magalhães	
Verificação	16/11/06	Marise Ventura Coutinho	
Aprovação	16/11/06	Mauro Carneiro	



Código
038.11.04.10.4.004

Revisão
000

Cópia
Não-Controlada

Página
5/11

Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

k) **detector de radiação:** foto diodos de silício.

Procedimentos de medida

b) **procedimento de medida:** ponto final contra branco;

c) **avaliação dependente do método:**

- absorbância;
- concentração por meio de fator;
- concentração por meio de fórmula Warburg;
- concentração por calibração com 1 a 10 padrões;
- calibração a 1 ponto (1 padrão);
- regressão linear (2 a 10 padrões);
- regressão não linear (polinômio 3º grau: 4 ou 5 a 10 padrões) com 1, 2 ou 3 determinações;
- para ácidos nucleicos: quociente 260/280, quociente 260/230, concentração molar, rendimento total.

	Data	Nome	Assinatura
Elaboração	16/11/06	José Cesamildo Cruz Magalhães	
Verificação	16/11/06	Marise Ventura Coutinho	
Aprovação	16/11/06	Mauro Carneiro	



Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

Manutenção

- a) lubrificar o rotor na primeira corrida, engraxar a pista do rotor com algum lubrificante (spray de silicone ou óleo light), ou a cada 30 horas de uso ou no mínimo de 15 em 15 dias;
- b) usar tubos e suportes apropriados ao rotor;
- c) fechar a tampa da centrífuga até ouvir um clique, pois do contrário a mesma não começará a girar;
- d) fechar a tampa da centrífuga refrigerada nos intervalos de uso, para evitar condensação;
- e) se a centrífuga emitir algum som diferente, esta deve ser desligada imediatamente no botão *STOP* na parte frontal da centrífuga;
- f) quando houver contaminação, após o uso, limpar com papel toalha, e jogar o papel contaminado no lixo biológico ou lixo químico. Usar pano úmido para limpeza diária;
- g) após o uso, retirar o rotor, lavar as cavidades com escova plástica, água e detergente e enxaguar com água destilada e colocar invertido sobre papel-toalha para secar ao ar;
- h) chame um técnico caso a centrífuga comece a emitir ruídos desconhecidos e se a lâmpada *brushes* (escovas) acender. As escovas ficam gastas e devem ser trocadas periodicamente.

Memória

- a) **método de memória:** 12 programas pré-programados, modificáveis;
- b) **memória de calibração:** para todos os procedimentos de calibração;
- c) **memória de resultados:** para 100 resultados, com valores de absorbância e razão, número da amostra, diluição, data e hora.



Código
038.11.04.10.4.004

Revisão
000

Cópia
Não-Controlada

Página
7/11

Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

Dados gerais

- a) **tensão:** (90 a 250) V; (45 a 65) Hz;
- b) **potência:** aproximadamente 20 W em funcionamento, aproximadamente 10 W em “stand by”;
- c) **dimensões/peso:** largura 20 cm; profundidade 32 cm; altura 10 cm, peso 3kg;
- d) **opção:** termoimpressora 40 caracteres/linha; bomba de aspiração, para análises rápidas de proteínas e medição de turvações;
- e) **conexão para impressora:** RS 232 C, serial.

Manutenção

- a) desconectar o aparelho da tomada antes de iniciar a limpeza ou a troca de fusíveis;
- b) limpar a parte externa do aparelho usando um pano levemente umedecido com uma solução de limpeza pouco concentrada;
- c) para a desinfecção do aparelho, usar um pano umedecido com solução de etanol 70%;
- d) não deixar que nenhum líquido penetre no aparelho;
- e) para limpar as cuvetas:
 - usar somente uma haste com algodão umedecido com sabão neutro e água destilada;
 - não usar álcool, nem qualquer substância corrosiva.
- f) quando não estiverem em uso, as cuvetas devem ser tampadas e guardadas no estojo próprio para não entrarem em contato com poeira.



Código
038.11.04.10.4.004

Revisão
000

Cópia
Não-Controlada

Página
8/11

Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

Verificação/Calibração

Este item não aplica-se ao documento.

Operação

- a) ligar o espectrofotômetro usando o interruptor localizado atrás do aparelho;
- b) o aparelho já vem com 12 métodos pré-programados de fábrica;
 - cada método tem um programa que contém diferentes parâmetros, tais como unidade de concentração e tipo de cálculo;
 - os programas podem ser mudados a qualquer tempo pressionando-se a tecla *Parameter*;
 - antes de usar um método pela primeira vez, deve-se acessar o programa correspondente e, se for o caso, fazer as adequações necessárias.

Para o cálculo da concentração de proteínas usando um padrão ($\mu\text{g/mL}$)

- a) selecionar o método proteína pressionando a tecla *4 Protein*;
- b) selecionar a calibração usando o padrão (STD), pressionando as teclas \blacktriangledown ou \blacktriangle ;
- c) confirmar a seleção pressionando a tecla *Enter* (depois da confirmação, aparece no visor o bloco de seleção seguinte);
- d) selecionar a unidade $\mu\text{g/mL}$ pressionando as teclas \blacktriangledown ou \blacktriangle ;
- e) confirmar pressionando a tecla *Enter*;



Código 038.11.04.10.4.004	Revisão 000	Cópia Não-Controlada	Página 9/11
-------------------------------------	-----------------------	---------------------------------------	-----------------------

Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

- f) entrar com a concentração padrão (STD); escolher o comprimento de onda desejado pressionando a tecla *5 OD 600*; pressionar duas vezes a tecla *0 Sample*; confirmar pressionando a tecla *Enter*;
- g) finalizar a configuração pressionando a tecla *Parameter*.

Para medir a concentração de DNA (fita dupla e simples), RNA e Oligonucleotídeos (µg/mL)

- a) pressionar uma das teclas para selecionar o método escolhido:
- tecla *6 Oligo*, para oligonucleotídeos;
 - tecla *7 dsDN*, para DNA fita dupla;
 - tecla *8 ssDNA*, para DNA fita simples;
 - tecla *9 RNA*, para RNA.
- b) entrar com a cuveta contendo a solução para zerar a medição e pressionar a tecla *Blank*;
- c) entrar com a cuveta contendo a amostra e pressionar a tecla *Sample*;
- d) a diluição da amostra que está na cuveta pode ser medida pressionando a tecla \blacktriangledown *Dilution* antes da medição começar. O valor da diluição será incluído automaticamente no cálculo do resultado;
- e) como indicativo da pureza da amostra de ácido nucléico que foi medida, a absorbância de (230, 280 e 320) nm, as proporções A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , o resultado da concentração e a absorbância do comprimento de onda de 260 nm são mostradas no visor. No caso de amostras puras, a absorbância de 320 nm deve ser de aproximadamente zero;
- f) se for necessária a conversão do resultado da medição, fazer os ajustes pressionando a tecla \blacktriangle *Conversion*; depois, pressionar *Enter*;
- g) fazer a medição da próxima amostra pressionando *Sample*.



Código 038.11.04.10.4.004	Revisão 000	Cópia Não-Controlada	Página 10/11
-------------------------------------	-----------------------	---------------------------------------	------------------------

Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

Procedimento para medições usando o método Bradford

- a) selecionar o método Bradford pressionando a tecla *1 Bradford*;
- b) selecionar *BRADFORD* para medição de amostras de alta concentração ou *BRAD.micro* para amostras de baixa concentração;
- c) entrar com a cuveta com a solução para zerar a medição e pressionar *Blank*;
- d) entrar com o primeiro padrão e pressionar *Standard*;
- e) entrar com o último padrão e pressionar *Standard*;
- f) se a amostra estiver diluída, fazer os ajustes pressionando a tecla **▼** *Dilution*;
- g) fazer a medição da amostra pressionando *Sample*.

5 ANEXOS

Este item não aplica-se ao documento.

6 REFERÊNCIAS

Complementares

EPPENDORF AG. **BioFotômetro**: manual de operação. Hamburgo, Alemanha, 2000, 139 p.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Código
038.11.04.10.4.004

Revisão
000

Cópia
Não-Controlada

Página
11/11

Título: PROCEDIMENTO DE OPERAÇÃO, MANUTENÇÃO E VERIFICAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

Circular
Técnica, 67

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61) 3340-3624

Ministério da
Agricultura,
Pecuária e
Abastecimento

<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2007):

Comitê de
Publicações

Presidente: Sergio Mauro Folle
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: Arthur da Silva Mariante
Maria da Graça S. P. Negrão
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves*

Loiola

Expediente