

Como calcular a concentração de uma substância em uma solução a partir de uma curva-padrão

Uma **curva-padrão** é utilizada para determinar **quantitativamente** uma propriedade de uma amostra desconhecida a partir de amostras com propriedades conhecidas.

Neste tutorial, iremos determinar a concentração de proteínas em uma amostra a partir de um método colorimétrico, o **ensaio de Bradford**. O reagente *Coomassie Brilliant Blue*, presente no reagente de Bradford, se torna azul ao se ligar à arginina e amino ácidos aromáticos das proteínas. Desta forma, ao se medir da absorbância no comprimento de onda 595 nm (azul) utilizando-se um **espectrofotômetro**, podemos estimar a concentração de proteínas (Figura 1).

NÃO SE ESQUEÇA DE DESCONTAR A ABSORBÂNCIA DO BRANCO!

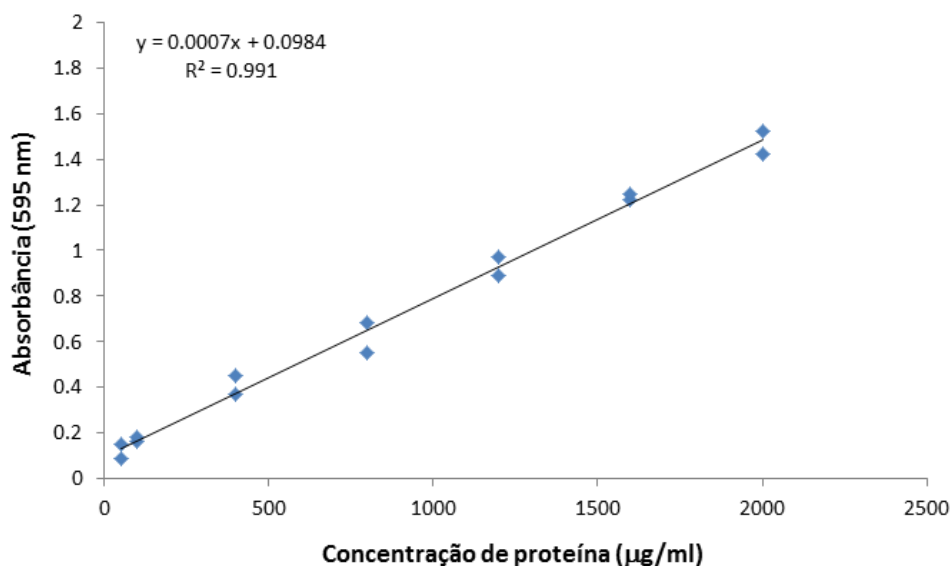


Figura 1 – Curva-padrão da Absorbância no comprimento de onda 595 nm de amostras com concentração de proteínas conhecidas misturadas com o reagente de Bradford

A princípio, quanto mais proteínas em sua amostra, mais azul ela se torna. No entanto, três situações podem ocorrer que poderão tornar sua curva-padrão menos precisa:

- 1- A concentração de proteínas é tão pequena que a cor azul não é percebida pelo espectrofotômetro;
- 2- A concentração de proteínas é tão grande que o reagente não é suficiente para marcar todas as proteínas;
- 3- Erros experimentais geram absorbâncias que não se correlacionam com a quantidade de proteínas.

Duas estratégias são utilizadas para se identificar pontos nestas situações: i) a utilização de múltiplas concentrações diferentes, e ii) a utilização de diversas réplicas, ou seja, a repetição das medições utilizando de amostras diferentes com a mesma concentração.

Veja a curva padrão abaixo:

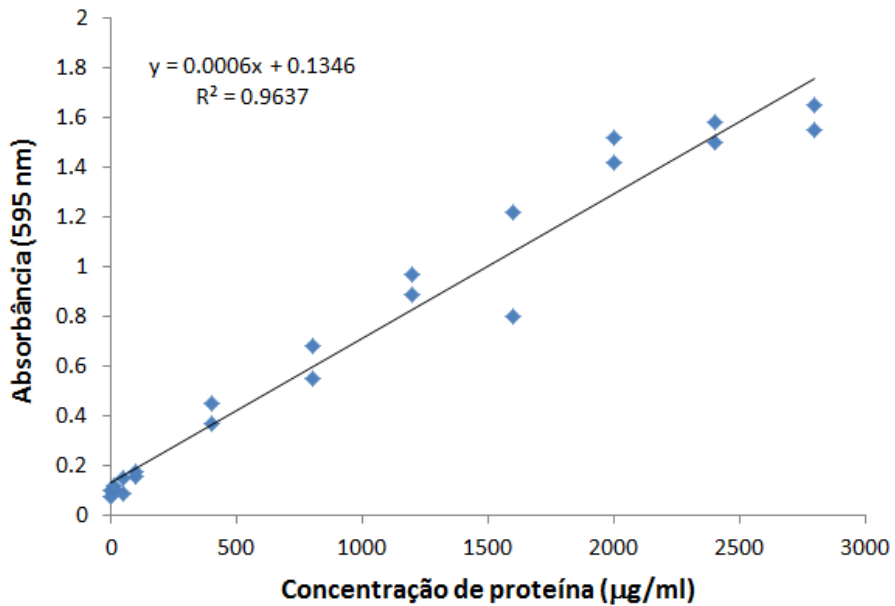


Figura 2 – Curva-padrão da Absorbância no comprimento de onda 595 nm de amostras com concentração de proteínas conhecidas misturadas com o reagente de Bradford. Neste exemplo, há muitos pontos discrepantes que fogem da reta de tendência.

Observe que há muitos pontos discrepantes. Na Figura abaixo, temos o mesmo gráfico com os pontos discrepantes ressaltados:

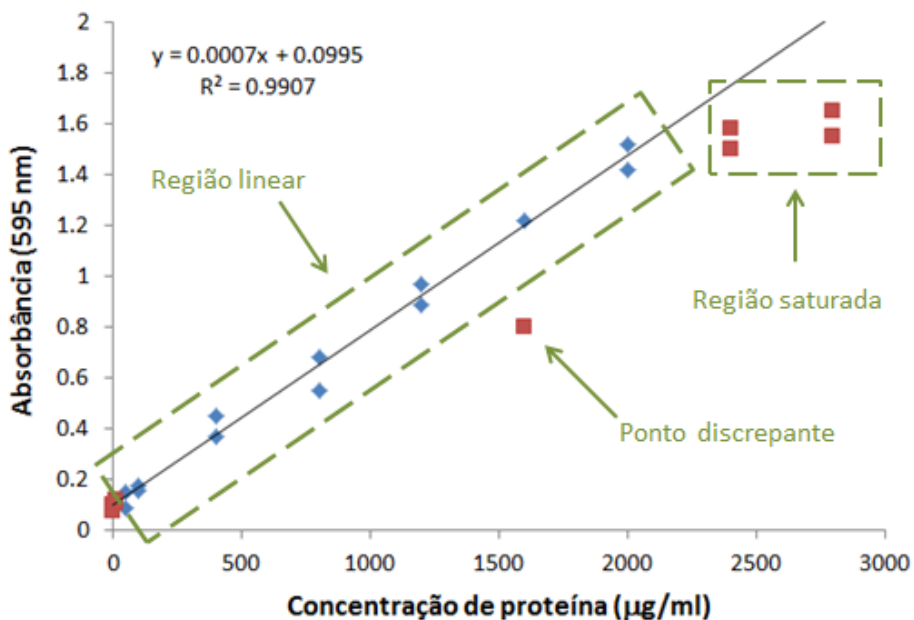


Figura 3 – Curva-padrão da Absorbância no comprimento de onda 595 nm de amostras com concentração de proteínas conhecidas misturadas com o reagente de Bradford. Neste exemplo, há exemplos onde a concentração de proteínas é muito baixa ou muito altas para serem corretamente medidas, e pontos discrepantes.

Para uma maior precisão, no exemplo acima, somente utilizamos amostras cuja absorvância se restringe à região linear da curva-padrão. No caso da curva padrão abaixo, somente absorvâncias entre 0.12 e 1.5 podem ser consideradas, o que corresponde a uma concentração de 50 µg/ml a 2000 µg/ml. Se a amostra gerar uma absorvância acima destes valores, deve-se diluir a amostra e uma nova medição deve ser feita (deve-se levar em conta a diluição depois).

Após identificarmos a fase linear da curva-padrão, devemos obter a sua equação da reta. A equação da reta pode ser obtida geometricamente, usando o gráfico desenhado em papel milimetrado; através de uma calculadora científica; ou através de um software, como o Microsoft Excel.

No exemplo acima, a equação da reta obtida a partir da curva-padrão é a seguinte:

$$Y = 0,0007x + 0,0984$$

Note que, substituindo-se y por Absorvância (A) e x por concentração de proteínas ([proteínas]), temos:

$$A = 0,0007 \times [\text{proteínas}] + 0,0984$$

ou seja, se quisermos converter as absorvâncias obtidas em concentração de proteínas, temos que usar a seguinte fórmula:

$$[\text{proteínas}] = \frac{(A - 0,0984)}{0,0007}$$

Após fazer as conversões, devemos observar se houve alguma amostra foi diluída e corrigir o valor para se chegarmos à concentração final da amostra. Se houver réplicas, o resultado final deve ser a média dos valores obtidos.

Resumo:

Para se converter os valores de absorvância para a concentração de proteínas (ou outra substância), siga os seguintes passos:

- 1- Retire os respectivos brancos de todos os pontos
- 2- Plote os pontos da curva-padrão;
- 3- Retire os pontos discrepantes e identificar a região linear da curva;
- 4- Calcule a equação da reta usando o gráfico, uma calculadora ou programa de análise;
- 5- Converta os valores da absorvância das amostras desconhecidas para concentração de proteínas (ou outra substância);
- 6- Corrija as concentrações obtidas pela diluição utilizada.