

ANÁLISES BIOQUÍMICAS QUANTITATIVAS CURVA-PADRÃO

Uma **curva-padrão** é utilizada para determinar **quantitativamente** uma propriedade de uma amostra desconhecida a partir de uma amostra com a mesma propriedade conhecida.

Por exemplo, é comum 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, torna-se azul ao se ligar a proteínas (principalmente aos seus resíduos de amino ácidos básicos, ou seja, Lys e Arg). Assim, submetendo diferentes quantidades de uma amostra conhecida de uma proteína, como a albumina de soro bovino (BSA) ao reagente de Bradford, a solução assume coloração azul e esta será mais intensa (mais azul) quanto maior a quantidade de albumina adicionada. A intensidade da cor azul pode ser medida num espectrofotômetro (ou leitor de placas) pela absorvância (Abs) da solução no comprimento de onda 595 nm (azul). Com essas medidas podemos estabelecer a relação que existe entre a Abs a 595 nm (Abs_{595nm}) e a quantidade de proteínas (Fig. 1).

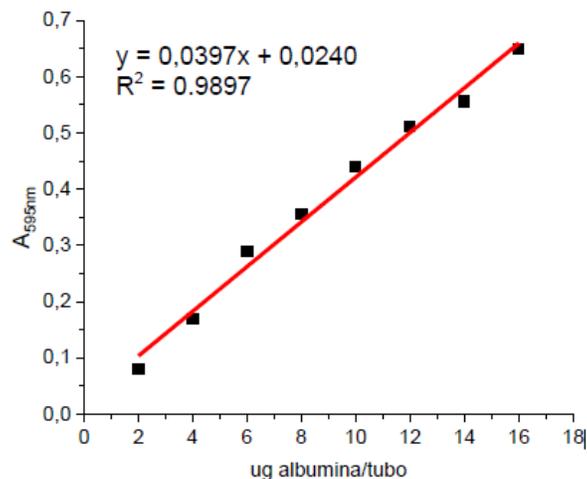


Figura 1. Curva padrão da Abs_{595nm} de amostras com quantidades de albumina conhecidas após reação com o reagente de Bradford

De fato, a Abs_{595nm} aumenta de forma proporcional à quantidade de proteína, seguindo a equação de uma reta

$$y = 0,0397x + 0,0240$$

onde $y = \text{Abs}_{595\text{nm}}$ e $x = \text{quantidade de albumina/tubo } (\mu\text{g proteína/tubo})$.

Com essa relação (reta), podemos estimar a concentração de proteínas de uma amostra desconhecida (Figura 1) desde que realizemos o mesmo protocolo experimental utilizado para determinar a curva padrão.

Para fazer uma curva padrão você deve realizar o experimento e plotar os resultados. Além disso, precisa obter a equação da reta para usá-la em outros experimentos nos quais precisa determinar a concentração de proteínas em suas amostras. A equação da reta pode ser obtida geometricamente usando o gráfico desenhado em papel milimetrado, por meio de uma calculadora científica ou por meio de um programa, como o Microsoft Excel.

No exemplo da Figura 1, a equação da reta obtida a partir da curva-padrão é a seguinte:

$$y = 0,0397x + 0,0240$$

Note que, substituindo-se y por Absorbância (A) e x por quantidade de proteína (μg), temos:

$$A = 0,0397 \times [\text{quantidade de proteína}] + 0,0240$$

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

$$[\text{quantidade de proteínas}] = \frac{(A - 0,0240)}{0,0397}$$

Cuidados necessários para obter uma curva padrão adequada.

Em princípio, quanto mais proteína em sua amostra, mais azul ela se torna. No entanto, três situações podem ocorrer, as quais tornariam sua curva-padrão menos precisa: (i) a concentração de proteínas é tão pequena que a cor azul não é medida pelo espectrofotômetro; (ii) a concentração de proteínas é tão grande que o reagente não é suficiente para marcar todas as proteínas e (iii); erros experimentais geram absorbâncias que não se correlacionam com a quantidade de proteínas (ou de outras substâncias) na amostra. Para evitar essas situações, duas estratégias são importantes: (i) utilizar várias concentrações diferentes da amostra padrão e (ii) realizar diversas réplicas, ou seja, repetir as medições utilizando amostras diferentes com a mesma concentração.

Por exemplo, o procedimento acima foi seguido para obter a curva padrão da Fig. 1. As medidas foram realizadas com três amostras (triplicata) de cada concentração da amostra padrão (segundo o protocolo mostrado na Tabela 1). As leituras foram feitas e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2. Em seguida se plotou a média dos valores obtidos para a Abs₅₉₅ nm versus a quantidade de albumina/tubo (Fig. 2). Fazendo isso se notou que os dois últimos pontos da curva desviavam da linearidade (Fig. 2) (veja como o valor de R² diminuiu e comparação com aquele da Fig. 1). Esses dois pontos indicam saturação (o reagente não foi suficiente para marcar toda quantidade de proteínas presentes nos tubos). Portanto, esses pontos foram eliminados e, com os resultados refinados foi obtida a curva da Fig. 1, a qual é a melhor curva padrão para futuros experimentos.

Protocolo:

Tabela 1

Tubo	Albumina 0,2 g/L (µL)	Água (µL)	Reagente de Bradford (mL)
branco	0	100	1
1	10	90	1
2	20	80	1
3	30	70	1
4	40	60	1
5	50	50	1
6	60	40	1
7	70	30	1
8	80	20	1
9	90	10	1
10	100	0	1

Tubo	Proteína (µg)	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média	Média - Branco
Branco	0	0.413	0.407	0.42	0.413333333	
1	20	0.489	0.499	0.492	0.493333333	0.08
2	40	0.578	0.586	0.585	0.583	0.169666667
3	60	0.703	0.71	0.694	0.702333333	0.289
4	80	0.758	0.768	0.778	0.768	0.354666667
5	100	0.849	0.853	0.856	0.852666667	0.439333333
6	120	0.92	0.926	0.931	0.925666667	0.512333333
7	140	0.964	0.977	0.967	0.969333333	0.556
8	160	1.07	1.08	1.06	1.066	0.652666667
9	180	1.06	1.07	1.07	1.063	0.649666667
10	200	1.06	1.06	1.07	1.062666667	0.649333333

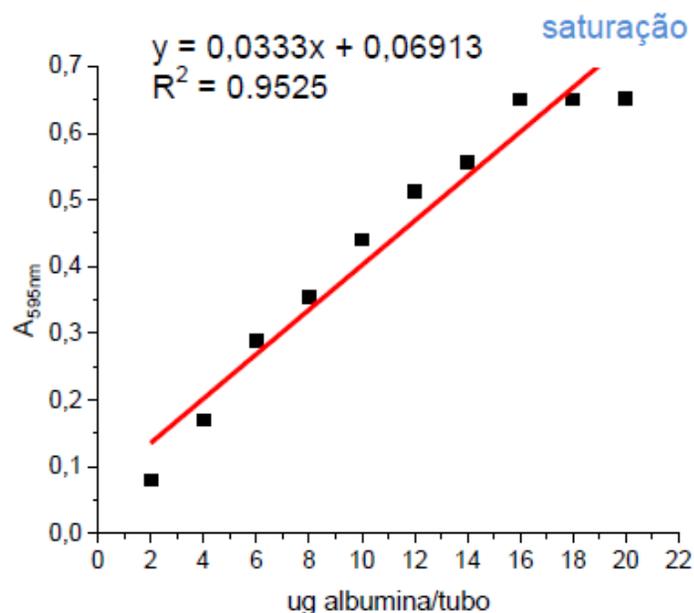


Figura 2. Curva padrão inicial obtidas com todos os dados da Tabela 2 mostrando a variação da Abs595nm de amostras com quantidades conhecidas de albumina após reação com o reagente de Bradford. Análise do gráfico obtido mostra que os 2 últimos pontos indicam saturação e portanto

eles foram omitidos para obter a melhor curva padrão resultante do experimento, ou seja, a curva padrão mostrada na Fig. 1.

Resumo: Para 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 identifique a região linear da curva; evidentemente, se vários dos pontos parecem discrepantes, significa que o experimento precisa ser repetido.
- 4- Calcule a equação da reta usando o gráfico, uma calculadora ou um programa de análise;
- 5- Converta os valores da absorvância de amostras desconhecidas para quantidade de proteínas (ou de outras substâncias);
- 6- Corrija as concentrações obtidas pela diluição utilizada.