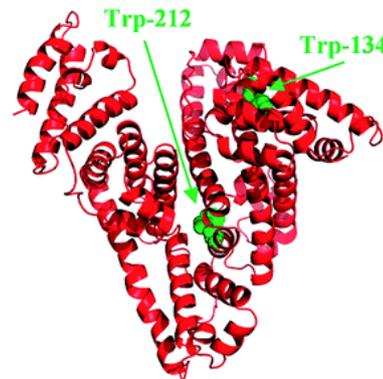


Técnicas Espectroscópicas em Biofísica Molecular, 4300435,
28/10/2015
3º Laboratório
Fluorescência

1. Objetivos

Análise comparativa dos espectros de absorção e emissão ópticas do aminoácido triptofano (Trp) e da proteína albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA, estrutura tridimensional ao lado, <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/an/c1an15550d>). A BSA é a proteína mais abundante em sangue bovino, com Peso Molecular $66,46 \times 10^3$ g/mol, 583 resíduos de aminoácidos, sendo **2 resíduos de Trp (nas posições 134 e 212)**, 27 resíduos de Phe e 20 resíduos de Tyr (veja os espectros de absorção óptica destes compostos nos slides da aula de Absorção Óptica).



2. Materiais e aparelhos usados

- Solução aquosa de Trp 60 μ M e BSA 30 μ M, em tampão 20 mM acetato/borato/fosfato, pH 7,5, e em etanol. Peso Molecular do Trp = 204.23 g/mol,
- Cubetas de caminho óptico de 1 cm.
- Aparelhos usados: espectrofotômetro *Varian Cary 50 UV/Visible*, e fluorímetro *VarianCary Eclipse* (Varian Australia PTY LTD, Mulgrave, VIC, Australia), com polarizadores. Temperatura ambiente.

3. Experimento e análise dos resultados

- a. Obter os espectros de absorção óptica das soluções de Trp e BSA, em tampão. Coloque os dois no mesmo gráfico. São iguais? São diferentes? Por quê?
- b. Obter o espectro de absorção óptica do Trp em etanol.
- c. Obter os espectros de fluorescência do Trp em tampão e em etanol. Coloque os dois no mesmo gráfico. Quais os comprimentos de onda usados para a excitação do fluoróforo? Por quê? Os dois espectros são iguais? Mesma intensidade? Mesma posição do máximo de emissão? Considerando o que aprendeu no curso, como você explica isso?
- d. Obter o espectro de fluorescência da BSA em tampão. Qual o comprimento de onda usado na excitação? Por quê?
- e. Compare os espectros de fluorescência do Trp e da BSA em tampão, colocando os dois em um mesmo gráfico. Os dois espectros são iguais? Mesma intensidade? Mesma posição do máximo de emissão? Considerando o que aprendeu no curso, como você explica isso?
- f. Meça a anisotropia de fluorescência para o Trp em tampão, e em etanol, no comprimento de onda do máximo de emissão fluorescente. Explique como foi feita a medida.
- g. Explique o que mede a anisotropia de fluorescência. Compare os valores medidos nos dois solventes, e discuta: São iguais? São diferentes? Por quê?
- h. Meça a anisotropia de fluorescência para a BSA em tampão, no comprimento de onda do máximo de emissão fluorescente.
- i. Compare os valores de anisotropia para o Trp e a BSA: São iguais? São diferentes? Por quê?
- j. Qual a massa de Trp colocada em 5 mL para o preparo da solução 60 μ M?
- k. Qual a massa de BSA colocada em 5 mL para o preparo da solução 30 μ M?

O Relatório (individual) deverá conter:

Introdução (máximo de uma página).

Materiais e Métodos: preparo da amostra, métodos e característica do aparelho utilizado (máximo de uma página).

Resultados e Discussões

Todos os pontos levantados acima.