

Prática: Espectro de absorção UV de aminoácidos ($\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ)

1) Objetivos

- Registrar o **espectro de absorção UV** de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano).
- Determinar o **comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$)** de cada composto.
- Estimar a **absortividade molar (ϵ)** por meio de curva de calibração (Lei de Beer–Lambert).
- Aplicar o método para **quantificar proteína** por medição em 280 nm.

2) Materiais e reagentes

- Espectrofotômetro UV-Vis e **cubetas de quartzo** ($b = 1,00$ cm).
- **Tampão fosfato 10 mM, pH 7,0**
- **Padrões:** L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptofano ($\geq 98\%$).
- Água Milli-Q.
- Pipetas e ponteiras; tubos de 1,5–15 mL; espectrofotometro.

3) Preparação de soluções

1. **A partir de soluções estoques (≈ 1 mM) de cada aminoácido preparado em tampão pH 7,0** foi feita a diluição para 50 μM
2. **Diluição para varredura:** 50 μM (para evitar $A > 1,2$).
3. **Série analítica para calibração (cada aminoácido, em seu $\lambda_{\text{máx}}$):** 0, 50, 100, 150 e 200 μM .

4) Ajuste do equipamento

- **Branco:** tampão pH 7,0.
- Varredura: **200–320 nm**, banda de passagem 10 nm.
- Modo baseline: subtrair branco antes das leituras.

5) Procedimento

5.1 Varredura espectral ($\lambda_{\text{máx}}$)

1. Enxágue a cubeta com a própria amostra (3 \times).
2. Registre o espectro (200–320 nm) para Phe, Tyr e Trp (50 μM).
3. **Identifique $\lambda_{\text{máx}}$** (pico principal) de cada aminoácido.

5.2 Curva de calibração (ϵ)

1. Selecione **um λ** (o $\lambda_{\text{máx}}$ encontrado) por aminoácido.
2. Meça **A** das soluções da série (0–30 μM).

3. Construa **A vs. c** (linha reta passando próximo da origem).
4. Ajuste linear: **inclinação = $\epsilon \cdot b$** → como $b = 1,00 \text{ cm}$, **$\epsilon = \text{inclinação}$** .

Observação: se o ajuste tiver intercepto $\neq 0$, reporte ϵ pela **inclinação** e discuta possíveis causas (baseline, espalhamento, erro de branco).

6) Relatório (itens mínimos)

- Gráficos: **espectros** (Phe, Tyr, Trp) e **curvas A vs. c**.
- **$\lambda_{\text{máx}}$** observado para cada aminoácido ($\pm 1 \text{ nm}$).
- ϵ (com incerteza do ajuste) e **R^2** .
- Discussão: influência do **pH**, possíveis deslocamentos de λ , comparação com literatura/fornecida.

7) Questões para fixação

1. Por que a **cubeta de quartzo** é necessária no UV?
2. O que causa **deslocamentos** de $\lambda_{\text{máx}}$ (efeitos de solvente/pH)?
3. Explique por que **Phe** absorve menos fortemente em 280 nm do que **Trp**.
4. Quais limitações do método A280 para proteínas **ricas/pobres** em aromáticos?
5. Como a **espessura da cubeta (b)** afeta a determinação de ϵ ?