

4. Técnicas Espectroscópicas

Faremos uma introdução sobre técnicas espectroscópicas utilizando os livros textos que constam nas referências: Lakowicz, 1983 e Freifelder, 1976.

4.1 Espectroscopia de Absorção

Moléculas absorvem luz. Os comprimentos de onda que são absorvidos e a eficiência da absorção dependem tanto da estrutura da molécula como do meio onde está a molécula, fazendo da espectroscopia uma ferramenta útil para caracterizar pequenas e grandes macromoléculas.

4.1.1 Teoria simples da absorção da luz por moléculas

Luz, em seu aspecto ondulatório, consiste de campos elétrico e magnético mutuamente perpendiculares, que oscilam senoidalmente à medida que se propagam pelo espaço. (Fig 4.1).

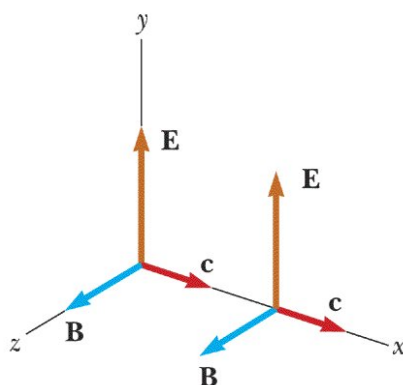


Figura 4.1 Propagação de uma onda eletromagnética, mostrando que o campo elétrico (**E**) e o campo magnético (**B**) são mutuamente perpendiculares.

Mas a luz também se comporta como um feixe de partículas, fótons. A energia E do fóton é $E = hc/\lambda = h\nu$, sendo h a constante de Planck, c a velocidade da luz, λ o comprimento de onda e ν a frequência. Quando uma onda eletromagnética encontra uma molécula, ela pode ser espalhada (sua direção de propagação muda) ou pode ser absorvida (sua energia é transferida à molécula). A probabilidade relativa da ocorrência de cada processo é uma propriedade particular da molécula encontrada. Se a energia eletromagnética da luz é absorvida, a molécula é dita estar excitada ou em um estado excitado. Uma molécula ou parte de uma molécula que pode ser excitada pela absorção é chamada de cromóforo.

Esta energia de excitação é usualmente convertida em calor (energia cinética) pela colisão de moléculas excitadas com outras moléculas (por exemplo: uma molécula do solvente). Com algumas moléculas esta energia é reemitida como fluorescência (o que veremos na próxima seção). Em ambos os casos, a intensidade da luz transmitida por um conjunto de cromóforos é menor que a intensidade da luz incidente.

Uma molécula excitada possuirá uma das possíveis quantidades discretas de energia descritas pelas leis da mecânica quântica, os níveis de energia da molécula. Os níveis de energia, em maioria, são determinados pelas possíveis distribuições espaciais dos elétrons e são chamados níveis eletrônicos de energia; sobre estes níveis existem os níveis vibracionais, que indicam os vários modos de vibração da molécula (o estiramento e dobra de várias ligações covalentes). Há também, subdivisões menores chamados de níveis rotacionais, que apresentam uma importância menor na espectroscopia de absorção. Todos estes níveis de energia são geralmente descritos por um diagrama de níveis de energia (Fig. 4.2). O mais baixo nível eletrônico é chamado de estado fundamental e todos os outros são estados excitados.

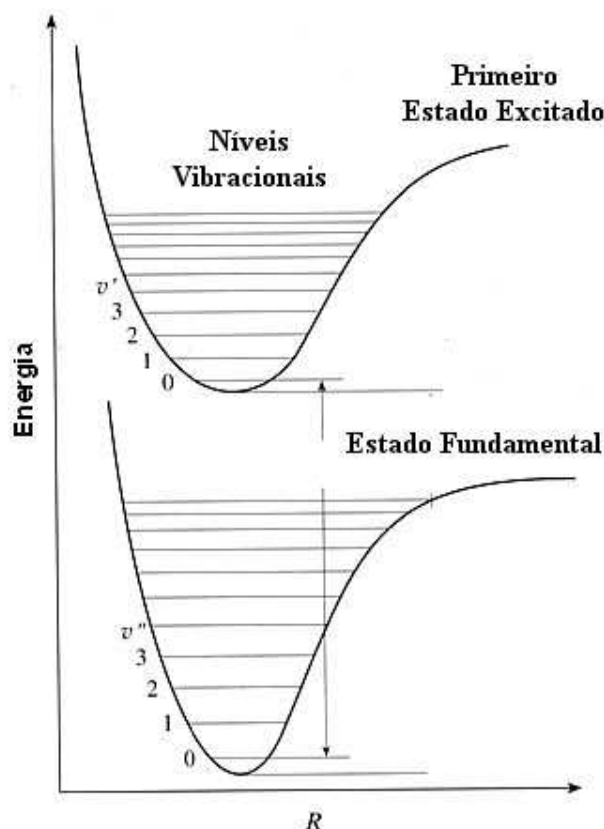


Figura 4.2 Típico diagrama de níveis de energia mostrando o estado fundamental e o primeiro estado excitado. Os níveis vibracionais são mostrados como linhas horizontais mais finas (www.chemkeys.com).

A absorção da energia é possível somente se a quantidade absorvida corresponde a diferença entre níveis de energia. Isto pode ser expresso pela expressão que correlaciona o comprimento de onda da luz (λ) com o nível de energia da molécula antes da absorção (E_1) e o nível de energia alcançado após a absorção (E_2): $\lambda = hc / (E_2 - E_1)$.

A mudança entre níveis de energia é chamada de transição. Uma transição entre níveis eletrônicos de energia representa a energia requerida para mover um elétron de uma órbita a outra. As transições são representadas por setas verticais no diagrama dos níveis de energia. (todas as transições não ocorrem com alta probabilidade, são determinadas pelas regras de seleção da mecânica quântica). A representação da probabilidade de absorção versus o comprimento de onda é chamado espectro de absorção e a espectroscopia de absorção tem por objetivo obter e analisar os dados de absorção. Se todas as transições estão somente entre o

nível vibracional mais baixo do estado fundamental e o primeiro estado excitado, então o espectro de absorção consistirá de uma seta, linhas discretas. No entanto, como as transições são possíveis do estado fundamental para qualquer dos níveis vibracionais e rotacionais do primeiro estado excitado e porque as linhas têm largura finita, o espectro aparecerá como uma curva relativamente suave. Para a maioria das moléculas, os comprimentos de onda correspondentes as transições entre o estado fundamental e qualquer nível vibracional do primeiro estado excitado estarão no intervalo da luz ultravioleta e da luz visível. Transições de baixa energia também são possíveis entre níveis vibracionais no interior de um mesmo nível eletrônico. Estas transições estarão na faixa do infravermelho. A Fig. 4.3 mostra o espectro eletromagnético.

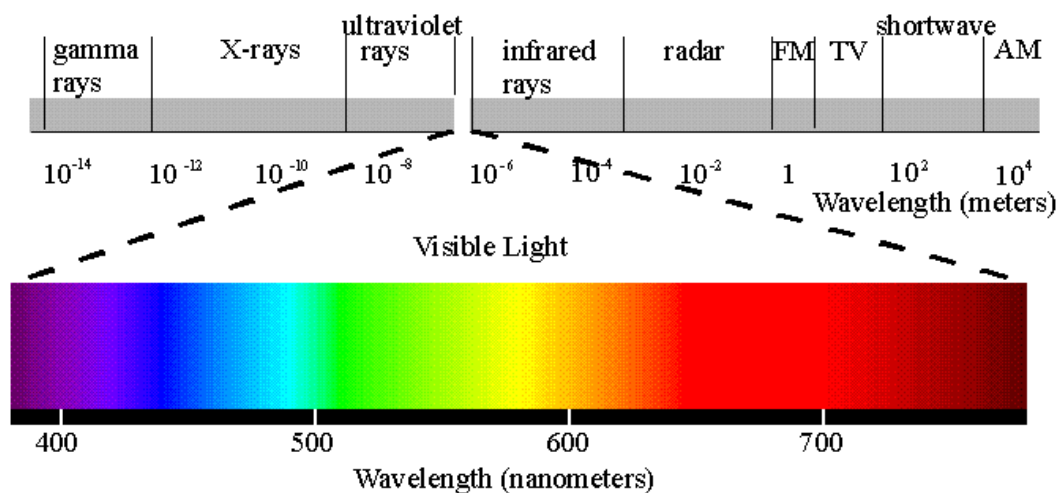


Figura 4.3 Parte do espectro eletromagnético com destaque para os comprimentos de onda da luz visível.

A probabilidade de absorção para um único comprimento de onda é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar para aquele comprimento de onda. Isto é mais facilmente definido em termos de como ele é medido. Se luz de intensidade I_0 passa através de uma substância (que pode estar em solução) de espessura d e concentração molar c , a intensidade I da luz transmitida obedece a lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon d c} \quad \text{ou} \quad \log(I/I_0) = -\varepsilon d c$$

em que ε é o coeficiente de absorção molar. Os dados de absorção podem ser colocados em porcentagem (%) de transmissão ($T = 100 I/I_0$) ou, mais comu-

mente, como a absorvância $A = \log (I_0 / I)$. Quando $d = 1$ cm, A é comumente chamado de densidade ótica (OD_λ), em que o índice λ informa o comprimento de onda em que a medida foi feita. A densidade ótica é conveniente, pois é igual a ϵc . Em alguns casos, se c é alto, ϵ aparece como uma função de c e pode ser dito que a lei de Beer-Lambert foi violada. Isto pode resultar do espalhamento ou das mudanças estruturais (por exemplo: dimerização, agregação, ou mudanças químicas) para concentrações altas.

4.1.2

Instrumentação para medição da absorvância no visível e ultravioleta

As medidas de absorvância são feitas em um espectrofotômetro. Como a maior parte dos estudos com biomoléculas são feitos com moléculas em solução, nos ateremos a amostras desse tipo. Apesar de variarem em desenho, todos os espectrofotômetros consistem de uma fonte de luz, um monocromador (para a seleção dos comprimentos de onda), um porta-amostra transparente chamado de cubeta, um detector de luz, e um registrador para acumular os dados de saída do detector. A Fig. 4.4 mostra o esquema do espectrofotômetro HP-8452A, com detecção por arranjo de diodos.

Em uma típica operação, é feita uma medição da luz transmitida somente pelo solvente (que pode ser um tampão ou uma solução de moléculas pequenas), seguida por uma medição da luz transmitida pela amostra quando dissolvida no mesmo solvente. O primeiro valor é, então, subtraído do segundo para se ter a absorvância do soluto. Isso é feito ao mesmo tempo para cada comprimento de onda da luz, de 2 em 2 nm, que atinge cada diodo do arranjo após ter passado por uma rede de difração. O instrumento é ajustado para fazer a operação eletronicamente ou através de software, mostrando o espectro na tela de um computador.

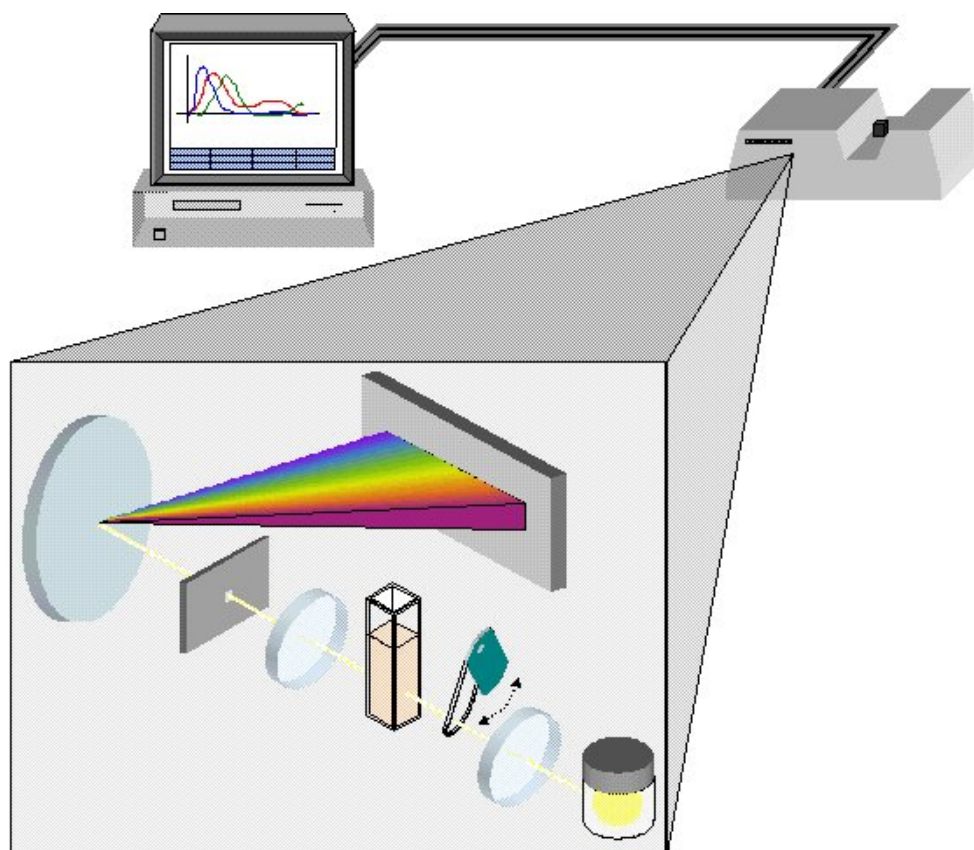


Figura 4.4 Esquema do espectrofotômetro HP-8452A. A luz da lâmpada passa através da amostra e solvente contidos em uma cubeta. Em seguida passa pela rede de difração, para seleção do comprimento de onda, e atinge o arranjo de diodos para a detecção (da Silva, Tese de mestrado, PUC-Rio).

4.1.2

Parâmetros medidos em espectroscopia de absorção

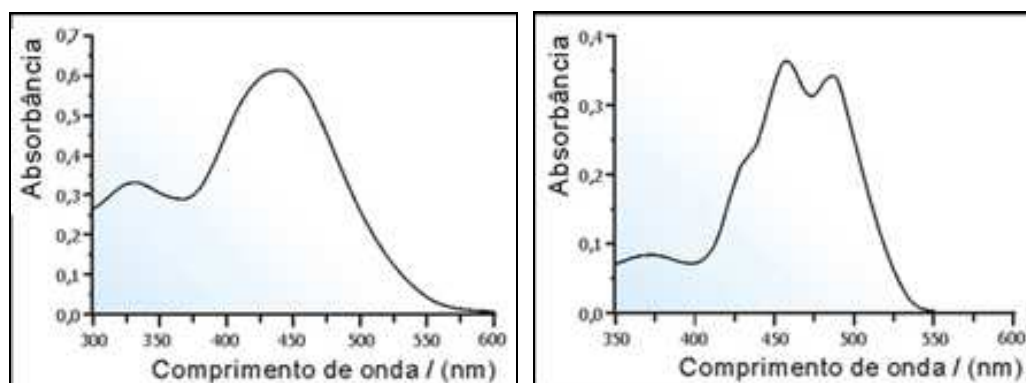


Figura 4.5 Exemplos de espectros de absorção. A partir de diferenças entre espectros de amostras, freqüentemente é possível identificar seus componentes moleculares (www.chemkeys.com).

A Fig. 4.5 mostra espectros na região UV-visível para duas moléculas biológicas. Os parâmetros usualmente medidos são DO (densidade ótica) ou ϵ (coeficiente de absorção molar). O comprimento de onda correspondente ao pico de absorção máxima é chamado $\lambda_{\text{máx}}$, e é para este comprimento de onda que ϵ é geralmente medido. Algumas das bandas de absorção consistem de múltiplos picos e os comprimentos de onda correspondentes a esses picos têm coeficiente de absorção molar menores que o do $\lambda_{\text{máx}}$ e são freqüentemente registrados.

4.1.3

Fatores que afetam as propriedades de absorção de um cromóforo.

O espectro de absorção de um cromóforo é primariamente determinado pela estrutura química da molécula. Entretanto, um grande número de fatores relacionados ao meio produz mudanças detectáveis em $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ . Fatores relacionados ao meio consistem em mudanças no pH (que produzem mudanças na estrutura da molécula), na polaridade do solvente ou de moléculas vizinhas, e a orientação relativa de cromóforos vizinhos. São estes efeitos do meio que dão as bases para o uso da espectroscopia de absorção na caracterização das macromoléculas.

As características gerais desses efeitos relativos ao meio são os seguintes:

Efeitos do pH. O pH do solvente determina o estado de ionização de cromóforos ionizáveis (protonação e desprotonação pelo H^+).

Efeitos da polaridade. Depende da estrutura do cromóforo e do tipo de transição. Para cromóforos polares, é freqüente (especialmente se a molécula contém O, N, ou S) que $\lambda_{\text{máx}}$ ocorra para um comprimento de onda menor em solventes polares hidroxílicos (H_2O , álcoois) que em solventes não polares.

Efeitos da orientação. Características geométricas (simetria, organização) freqüentemente têm fortes efeitos sobre $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ . O melhor exemplo é o hipocromismo de ácidos nucleicos.

Como resultado de um grande número de estudos envolvendo compostos biológicos e macromoléculas cujas estruturas são bem conhecidas em várias condições, um conjunto de fatos empíricos levou à construção de regras para a

interpretação de espectros de absorção de biomoléculas. As regras mais comuns são:

1. Se os aminoácidos triptofano, tirosina, fenilalanina e histidina são desviados para um meio menos polar, $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ aumentam. Então:

- a. Se o espectro de um destes aminoácidos em uma proteína em um solvente polar mostra que $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ são mais altos que os valores para os aminoácidos livres no mesmo solvente, então os aminoácidos devem estar em uma região interna da proteína e cercados por aminoácidos não polares.
- b. Se o espectro de uma proteína é sensível a mudanças na polaridade do solvente, o aminoácido mostrando as mudanças em $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ deve estar sobre a superfície da proteína (se não induzir mudanças conformacionais que exponham o aminoácido).

2. Para aminoácidos, $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ sempre aumentam se um grupo titulável (o OH da tirosina, o imidazol da histidina, e o SH da cisteína) estiver carregado. Então:

- a. Se nenhuma mudança espectral for observada para um desses cromóforos e se o pH for tal que ocorra a titulação do aminoácido livre, o cromóforo deve estar localizado em uma região não polar da proteína.
- b. Se a mudança espectral como uma função do pH indica que o grupo protonável tem o mesmo pK como teria se estivesse livre em solução, então o aminoácido está sobre a superfície da proteína.
- c. Se a mudança espectral como uma função do pH indica um pK muito diferente, então o aminoácido deve estar em um meio fortemente polar ou cercado por grupos carregados (por exemplo: uma tirosina cercada por grupos carboxílicos).

3. Para purinas e pirimidinas, ϵ diminui à medida que seus sistemas de anéis tornam-se paralelos e empilhados.

4.2

Fluorescência no Estado Estacionário

Em algumas moléculas, a absorção de um fóton é seguida por emissão de luz de um comprimento de onda maior (menor energia). Esta emissão é chamada de fluorescência, transição de estado singlete para singlete (ou fosforescência, se a transição for de estado tripleto para singlete). Como na espectroscopia de absorção, há muitos fatores que alteram o espectro de fluorescência, portanto a eficiência da fluorescência é dependente desses fatores relacionados ao meio em que a amostra está inserida. As medidas de fluorescência são mais sensíveis que as medidas de absorvância, apesar da espectroscopia de absorção ser mais simples de se realizar. As medidas de fluorescência de macromoléculas podem nos dar informações sobre: conformação, sítios de ligação, interações com solventes, grau de flexibilidade, distâncias intermoleculares e coeficiente de difusão rotacional de macromoléculas.

A teoria da fluorescência não é ainda adequada para permitir uma correlação positiva entre o espectro de fluorescência e as propriedades do meio da amostra emissora. Mais uma vez a utilidade da técnica é baseada em princípios experimentais estabelecidos a partir de estudos com compostos modelos.

4.2.1

Teoria da Fluorescência

Como já mencionado na seção anterior, as moléculas têm níveis discretos de energia. Os níveis de energia de uma molécula são descritos pelo diagrama de níveis de energia da Fig. 4.6.

No diagrama são mostrados dois níveis eletrônicos, o de menor energia ou estado fundamental (G) e um de maior energia ou primeiro estado excitado (S1) e alguns dos níveis vibracionais de cada um.

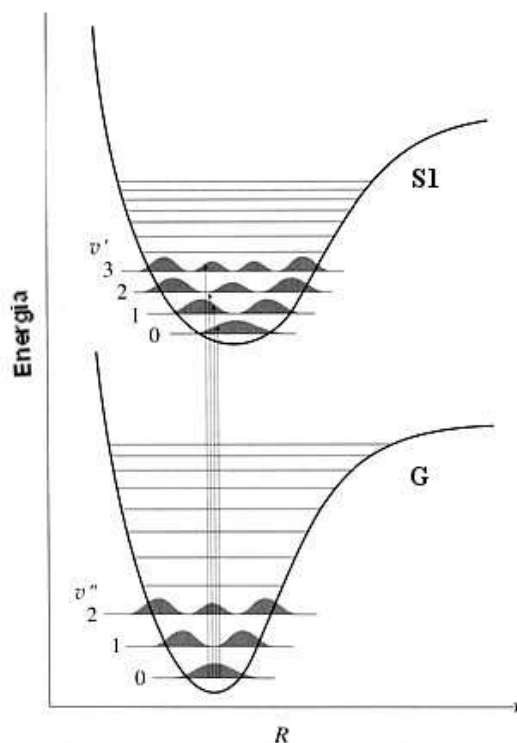


Figura 4.6 Diagrama de níveis de energia de um cromóforo. G e S1 indicam o estado fundamental e o primeiro estado excitado, respectivamente. Os estados vibracionais são representados pelas linhas finas horizontais. Esta molécula absorve luz pelas transições indicadas no diagrama. Depois da excitação, há perdas vibracionais para o nível mais baixo do primeiro estado excitado e então é capaz de emitir luz por fluorescência a partir desse estado (www.chemkeys.com).

Quando a energia da luz é absorvida, a molécula passa de um nível de energia mais baixo para um mais alto (nem toda transição é possível, as transições possíveis são definidas pelas regras de seleção da mecânica quântica). Cada transição está indicada no diagrama por linhas verticais. Se a molécula está inicialmente não excitada (no seu estado fundamental, G) e a energia absorvida é maior que aquela necessária para passar ao primeiro estado eletrônico excitado, S1, o excesso de energia pode ser absorvido como energia vibracional e a molécula estará em um dos níveis vibracionais mostrados na Fig. 4.6. Esta energia vibracional é rapidamente dissipada como calor pelas colisões com as moléculas do solvente (se a molécula excitada está em solução), e a molécula passa ao nível vibracional mais baixo de S1. A molécula excitada, então, retorna a G pela emissão de luz (fluorescência) ou por uma transição não-radiativa. Como parte da energia é perdida para o nível mais baixo de S1, a luz emitida terá menos energia

(maior comprimento de onda) que a luz absorvida. Assim, a luz de fluorescência terá sempre um comprimento de onda maior que a luz de excitação. No entanto, ao retornar para G, a molécula pode ficar em um nível vibracional que não seja o fundamental absoluto; esta energia vibracional será, também, dissipada em forma de calor. Se existirem diferentes absorvedores, a luz emitida será composta de diferentes comprimentos de onda (todos maiores que aqueles da luz absorvida); a probabilidade de decaimento do primeiro estado excitado para cada nível vibracional do estado fundamental determina a forma do espectro de fluorescência. Na Fig. 4.7 são mostrados espectros típicos de absorção, de excitação e emissão de fluorescência (A), bem como espectros de excitação e emissão de fluorescência do triptofano (B).

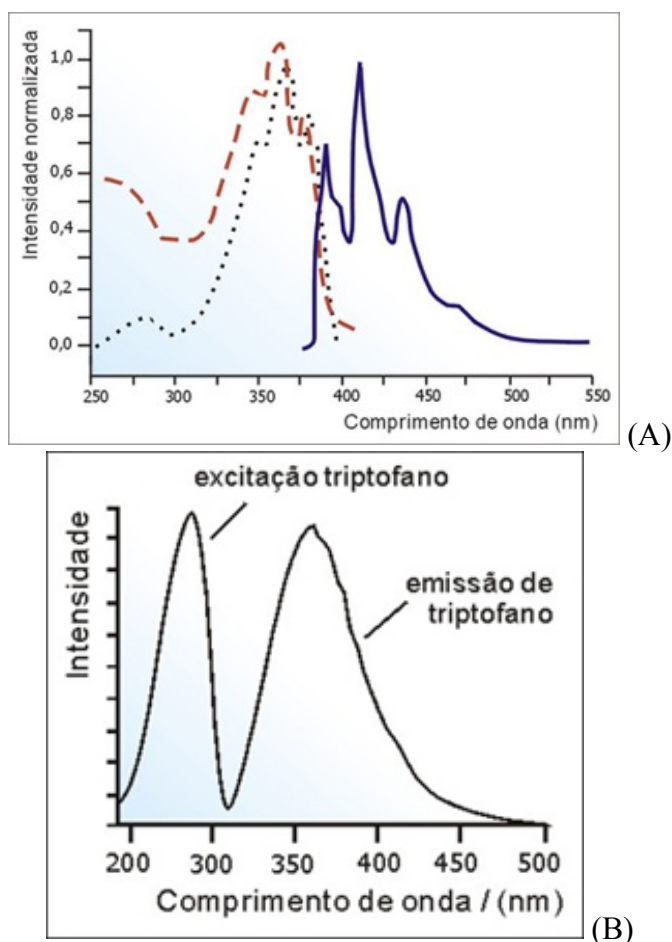


Figura 4.7 Espectros típicos de absorção (tracejado), excitação (pontilhado) e emissão (contínuo) de fluorescência (A), bem como espectros de excitação e emissão de fluorescência do triptofano (B) (www.chemkeys.com).

Como visto antes, uma molécula excitada nem sempre fluoresce. A probabilidade da fluorescência é descrita pelo rendimento quântico, Q , que é a

razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos. Muitos fatores determinam Q , alguns deles são propriedades da própria molécula (fatores internos) e outros são devidos ao meio em que se encontra (ambiente). Os fatores internos derivam principalmente da distribuição dos níveis vibracionais entre G e S. Por exemplo, se um nível vibracional (V_G) do estado fundamental tem a mesma energia de um nível vibracional de ordem mais baixa do primeiro estado excitado (V_S), pode ocorrer uma transição não-radiativa de V_S para V_G , seguido da conversão da energia de V_G em calor. Isto é o que normalmente acontece com moléculas flexíveis, devido aos muitos níveis vibracionais altos de G. Este é o meio mais comum para dissipar a energia de excitação e devemos considerar que as moléculas fluorescentes (fluoróforos) são raras e que são quase invariavelmente compostas por anéis aromáticos rígidos ou por sistemas de anéis.

Os fatores internos não são geralmente de interesse para estudos de propriedades das macromoléculas. Os fatores do meio são mais importantes. O efeito do meio é, primariamente, fornecer processos não-radiativos que competem com a fluorescência e dessa forma reduzem o rendimento quântico Q ; esta redução de Q é chamada de supressão da fluorescência. Em sistemas biológicos, a supressão é normalmente o resultado dos processos de colisão (desde uma reação química até uma simples colisão com troca de energia) ou um processo radiativo mais longo chamado transferência ressonante de energia. Estes três fatores são expressos em uma situação experimental, envolvendo soluções e compostos dissolvidos que interagem com o fluoróforo (chamados supressores de fluorescência), da temperatura, do pH, dos grupos químicos vizinhos, ou da concentração do fluoróforo. O fluoróforo isolado não apresenta processos não-radiativos para perda de energia, mas somente fluorescência.

4.2.2

Instrumentação para Medição da Fluorescência

A Fig. 4.8 mostra um arranjo padrão para medidas de fluorescência. Um feixe de luz de alta intensidade passa através de um monocromador para a seleção de um comprimento de onda de excitação (um comprimento de onda eficientemente absorvido pelo fluoróforo). O feixe de luz de excitação passa através de uma célula contendo a amostra. Para evitar a detecção do feixe incidente, pode-se fazer a observação da fluorescência em ângulo reto com o feixe

incidente, pois a amostra irá emitir em todas as direções. A luz emitida (fluorescência) passa através de um monocromador para a análise do comprimento de onda e depois vai para um detector fotossensível (tubo fotomultiplicador). Programas de computador automaticamente varrem os comprimentos de onda detectados e apresentam a intensidade de emissão como uma função do comprimento de onda da luz emitida.

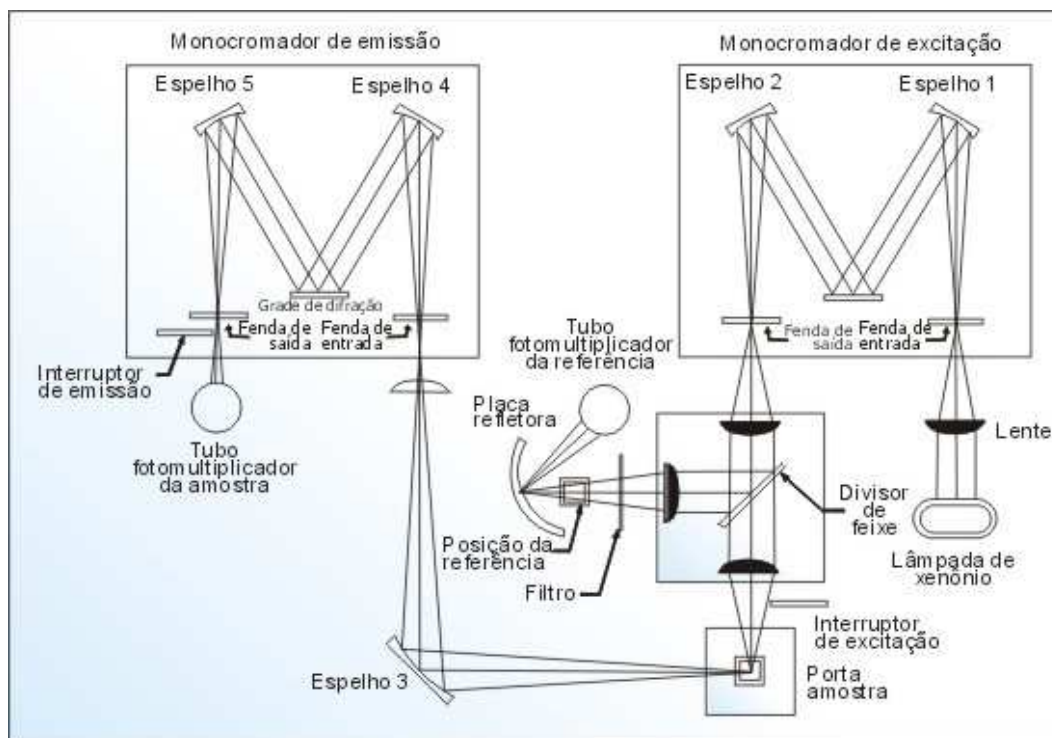


Figura 4.8 Esquema de um sistema de fluorescência semelhante ao utilizado no presente trabalho. A fluorescência é emitida em todas as direções pela amostra, mas a maioria dos sistemas analisa somente a que é emitida a 90° em relação à luz de excitação (www.chemkeys.com).

A intensidade da luz é uma medida da energia E por unidade de área por unidade de tempo. Devido à resposta dos detectores de luz (tubos fotomultiplicadores) ser dependente do comprimento de onda e sendo $E = hc/\lambda$, a razão das saídas (correntes elétricas) produzidas pelo fotomultiplicador quando dois comprimentos de onda diferentes chegam nele, não são as mesmas que a razão das intensidades. No entanto, na maioria dos experimentos, uma simples medida da saída do fotomultiplicador é suficiente, porque somente intensidades relativas para cada comprimento de onda estão sendo medidas – por exemplo, a

medida de fluorescência na presença e na ausência de um agente, se o agente não afeta a eficiência de absorção da luz de excitação. Entretanto, em alguns experimentos, é necessário medir Q ou determinar a distribuição da energia absoluta de um espectro de fluorescência; ambos requerem medidas de intensidade absolutas. Para medir Q devemos fazer a contagem dos fótons, pois: $Q = \text{fótons emitidos} / \text{fótons absorvidos}$. Q é uma quantidade adimensional. Como a energia, E , de um fóton é relacionada à frequência, ν , da luz pela relação $E = h\nu$, uma medida do número de fótons requer a medida da energia da radiação e a correção pela frequência. Medir o rendimento quântico absoluto é um processo difícil e tedioso e é raramente feito. O método usual para determinar Q requer a comparação com um fluoróforo de Q conhecido; duas soluções são preparadas – uma da amostra e outra do fluoróforo padrão – e, com a mesma fonte de excitação, a fluorescência integrada (a área do espectro) de cada uma é medida.

Muito freqüentemente, os espectros são mostrados como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) versus λ . De fato, é raro medir-se Q .

4.2.3

Medidas de fluorescência intrínseca para estudo de proteínas

Dois tipos de fluoróforos são usados em análise de fluorescência de macromoléculas – fluoróforos intrínsecos (contidos nas macromoléculas) e fluoróforos extrínsecos (adicionados ao sistema, normalmente ligados a um de seus componentes).

Para proteínas, há somente três fluoróforos intrínsecos – triptofano, tirosina e fenilalanina (em ordem de maior para menor Q). A fluorescência de cada um deles pode ser distinguida pela excitação e observação em comprimentos de onda apropriados. Na prática, a fluorescência do triptofano é a mais comumente estudada, porque a fenilalanina tem um Q muito baixo e a fluorescência da tirosina é freqüentemente muito baixa devido à supressão. A fluorescência da tirosina é quase totalmente suprimida se ela estiver ionizada, ou próxima de um grupo amino, um grupo carboxil, ou um triptofano. Em situações especiais, no entanto, pode-se detectá-la com excitação de 280 nm.

A principal razão para estudar a fluorescência intrínseca de proteínas é obter informações sobre sua conformação. Isto é possível porque a fluorescência tanto

do triptofano quanto da tirosina dependem fortemente do seu ambiente (por exemplo: solvente, pH, a presença de um inibidor, uma molécula pequena ou um grupo vizinho na proteína).

O uso das medidas de fluorescência intrínseca em proteínas é baseado em regras empíricas obtidas de estudos de compostos modelos cujas estruturas e conformações são bem conhecidas. As regras de uso mais comum são:

1. Toda fluorescência de uma proteína é devido ao triptofano, tirosina e fenilalanina.
2. O $\lambda_{\text{máx.}}$ do espectro de fluorescência do triptofano desvia-se para comprimentos de onda menores e a intensidade aumenta quando a polaridade do solvente diminui.
 - a. Se $\lambda_{\text{máx.}}$ é desviado para comprimentos de onda menores quando a proteína está em um solvente polar, o triptofano deve estar internamente e em um ambiente não polar. (Um desvio do $\lambda_{\text{máx.}}$ em uma macromolécula é em relação ao $\lambda_{\text{máx.}}$ do aminoácido livre na água).
 - b. Se $\lambda_{\text{máx.}}$ é desviado para comprimentos de onda menores quando a proteína está em um meio não polar, ou o triptofano está na superfície da proteína ou o solvente induz uma mudança conformacional que traz o triptofano para a superfície.
3. Se a substância for um inibidor (se ela inibe a fluorescência de um aminoácido livre), como iodeto, nitrato ou íons de cério, suprimem a fluorescência do triptofano ou da tirosina, os aminoácidos devem estar na superfície da proteína. Se não ocorrer a supressão, então:
 - a. O aminoácido pode ser interno.
 - b. O aminoácido pode estar em uma fresta de dimensões tão pequenas que o inibidor não pode entrar em contato com ele.
 - c. O aminoácido pode estar em uma região altamente carregada e a carga pode repelir o supressor. Por exemplo, o íon iodeto (um inibidor negativo) falha em inibir a fluorescência do triptofano se o triptofano estiver em uma região carregada negativamente; o íon Cs^+ não atua se o fluoróforo estiver em uma região positiva. O supressor neutro, acrilamida, não é afetado pela carga.

4. Se a substância não afeta o rendimento quântico do aminoácido livre, mas afeta a fluorescência da proteína, então deve estar ocorrendo uma mudança conformacional na proteína.
5. Se triptofano ou tirosina estão em um meio polar, seus rendimentos quânticos (Q) diminuem com o aumento da temperatura, T, ao passo que, em um meio não-polar, ocorre uma mudança pequena. Conseqüentemente, desvio do decrescimento padrão (monotônico) de Q com aumento de T indica que o aquecimento está induzindo uma mudança conformacional, pois a polaridade das regiões nas quais o triptofano está sendo exposto devem estar se modificando. Um aumento da dependência de Q com a temperatura, quando a proteína está em um solvente polar, como a água, indica que mais moléculas de triptofano estão sendo expostas ao solvente, ou seja, a proteína está se desenovelando.
6. O rendimento quântico (Q) do triptofano e da tirosina decresce se o grupo α -carboxil destes aminoácidos estiver protonado.
7. A fluorescência do triptofano é suprimida pela presença de grupos ácidos protonados. Conseqüentemente, se o pK medido por monitoração da fluorescência do triptofano é o mesmo que o pK de um grupo ionizável conhecido (por exemplo: o imidazole de histidina ou a ligação SH de cisteína), então este grupo deve estar muito perto de um triptofano. No entanto, esta regra só se aplica se for possível mostrar, de modo independente, que a mudança de pH não leva a mudança conformacional.
8. Se uma substância qualquer liga-se a uma proteína e a fluorescência do triptofano é suprimida, pode estar ocorrendo: i) mudança conformacional total devido à ligação; ou ii) algum triptofano está no sítio de ligação, ou muito próximo dele.

Observações: Dois pontos importantes devem ser ressaltados sobre as regras acima: 1- A fluorescência é muito sensível a fatores do meio. Então outras interpretações devem sempre ser levadas em conta, para os resultados descritos nessas regras. 2- Se uma proteína contém muitos triptofanos, como geralmente acontece, cada um pode ter um rendimento quântico diferente. Portanto, a magnitude absoluta das mudanças não pode ser usada para determinar a fração em um dado meio – por exemplo, interno versus externo.