

# QUÍMICA QUÂNTICA E ESPECTROSCOPIA

Igor Khmelinskii, FCT, DQBF  
Modulo IV, ano lectivo 2007-2008

T10

# Espectroscopia óptica e fotobiología

Cap. 13

Peter Atkins, Julio de Paula

Physical Chemistry for Life Sciences

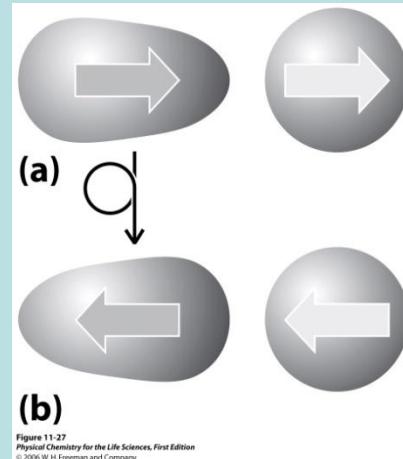
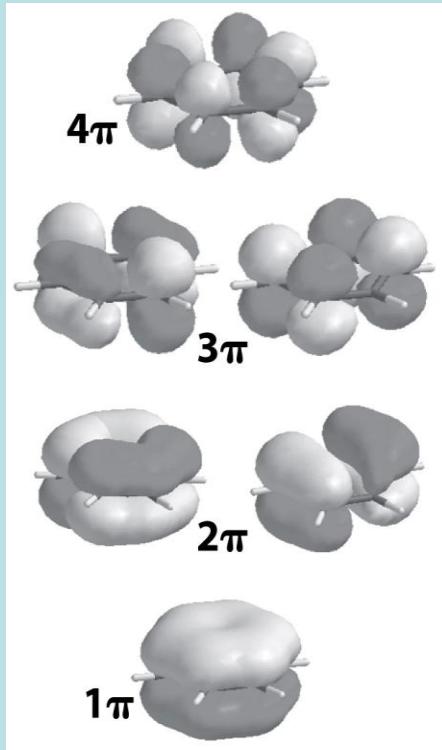
Recursos (Living graphs):

<http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199280957/01student/graphs/ch13/>

Recursos (Web links):

<http://www.oup.com/uk/orc/bin/9780199280957/01student/weblinks/part4/>

# Correcção de erros das aulas TP

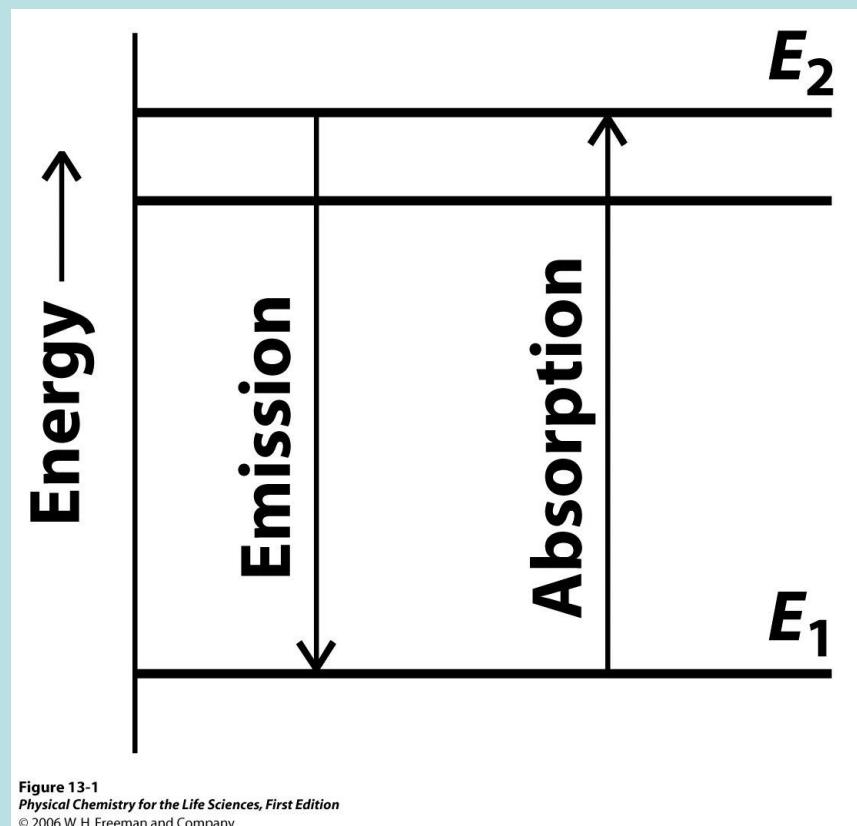


$$V = -\frac{\mu_1^2 \alpha'_2}{4\pi\epsilon_0 r^6}$$

- Simetria de Estados  $\pi$  do Benzeno
- Fórmula da interacção dipolo permanente – dipolo induzido (p. 466 do livro)

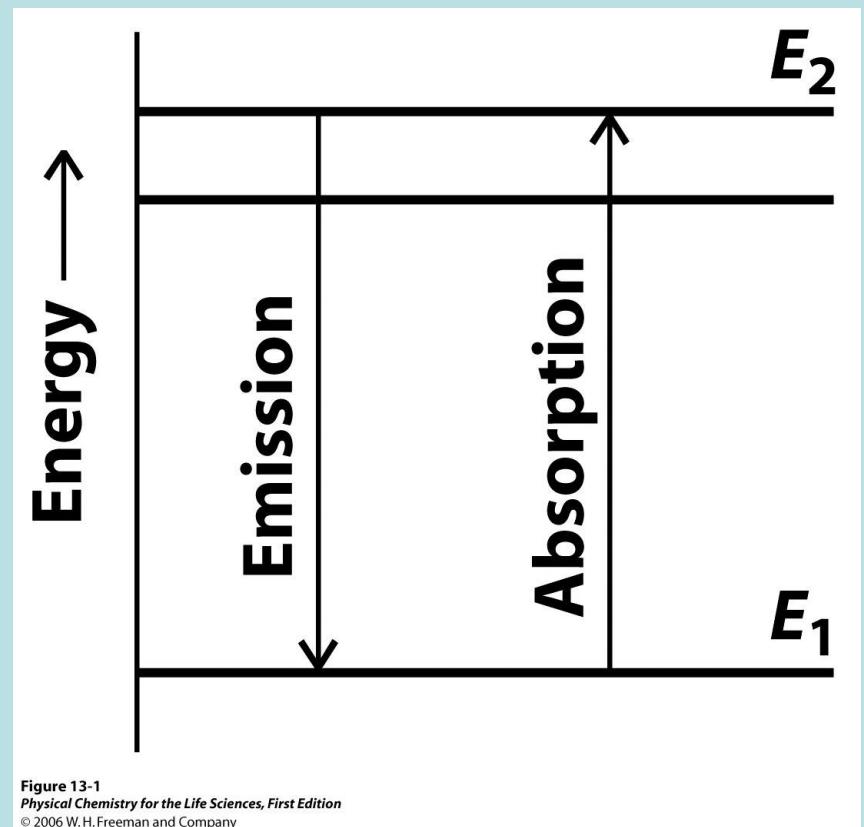
# Espectroscopia: ideias gerais

- Espectroscopia de emissão: a molécula passa do estado de energia elevada  $E_2$  para o estado de energia mais baixa,  $E_1$ , emitindo o excesso na forma do fotão
- Mede-se a intensidade de emissão



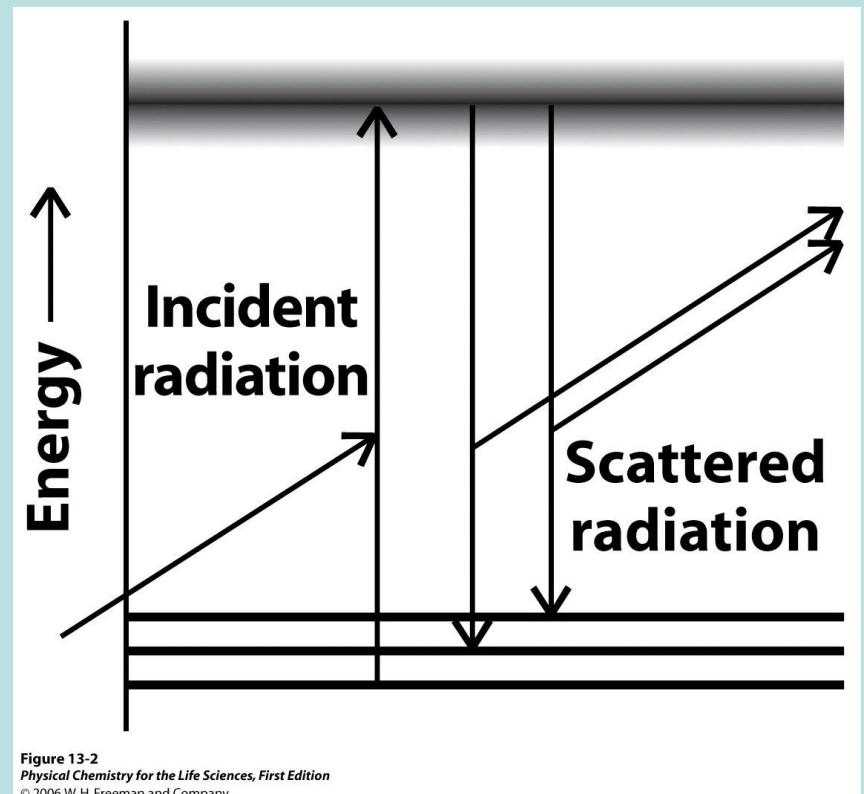
# Espectroscopia: ideias gerais

- Transição de um estado de energia mais baixa,  $E_1$ , para um estado de energia mais elevada,  $E_2$ .
- Espectroscopia de absorção: mede-se a intensidade de absorção em função da frequência ou c.d.o.



# Espectroscopia: ideias gerais

- Espectroscopia de Raman: incide luz monocromática; medem-se as frequências presentes na luz *espalhada* pela amostra.



# Espectroscopia: ideias gerais

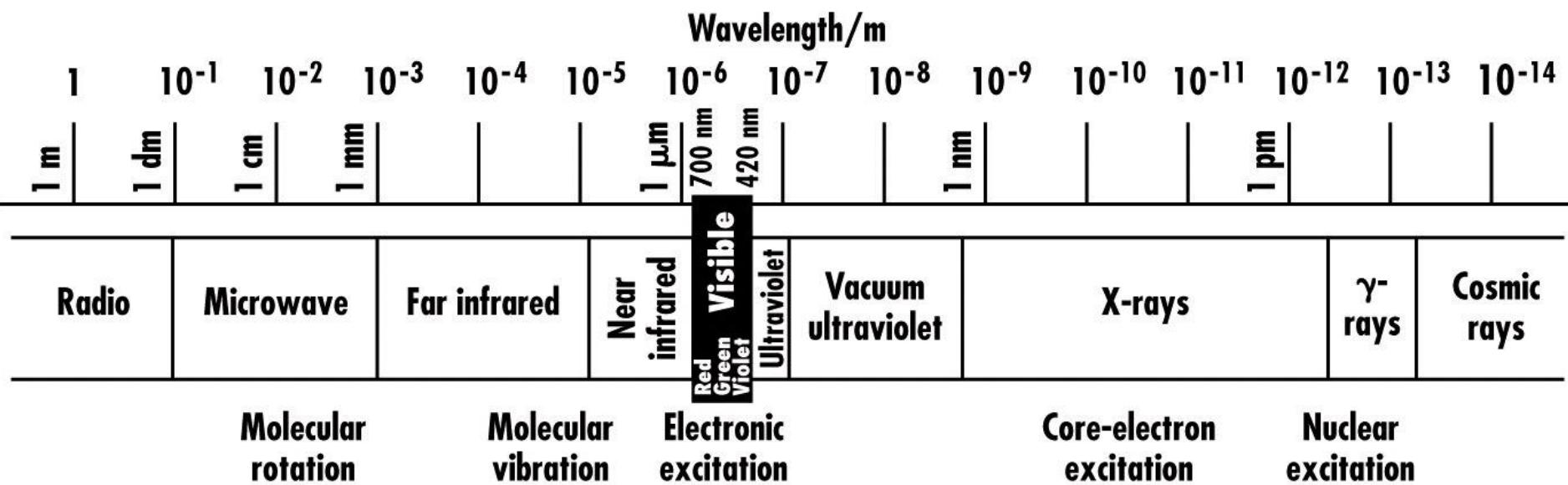
$$h\nu = |E_1 - E_2|$$

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

- Número de onda (Infravermelhos, espectroscopia de vibrações moleculares); mede-se em  $\text{cm}^{-1}$ .

# Espectroscopia: ideias gerais



**Figure 9-2**  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Espectroscopia: ideias gerais

- Transições vibracionais (infravermelho)
- Transições electrónicas (UV e visível)

# Métodos experimentais

- Espectrómetro:
  - fonte da radiação
  - luz transmitida, emitida ou espalhada pela amostra é
  - colectada,
  - monocromatizada e
  - analisada pelo detector

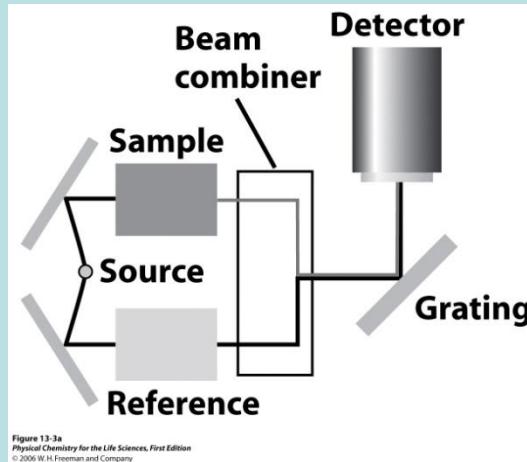


Figure 13-3a  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

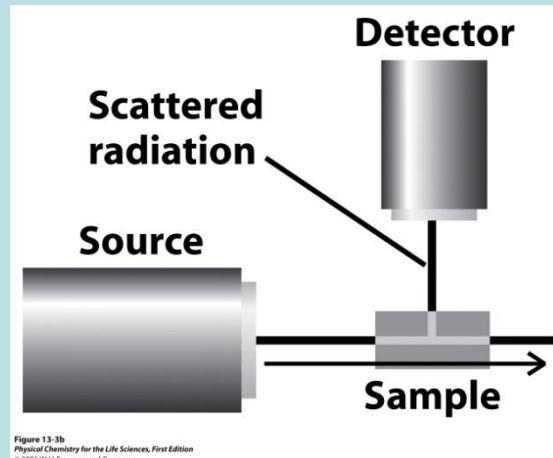


Figure 13-3b  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Fontes e detectores

- Infravermelho distante (de 35 até 200  $\text{cm}^{-1}$ ): descarga em vapores de Hg
- Infravermelho médio (200 até 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) Globar ou fio de Nernst
- Visível: lâmpada de W-I
- UV: lâmpada de  $\text{D}_2$  ou Xe
- Elemento dispersivo: rede de difracção

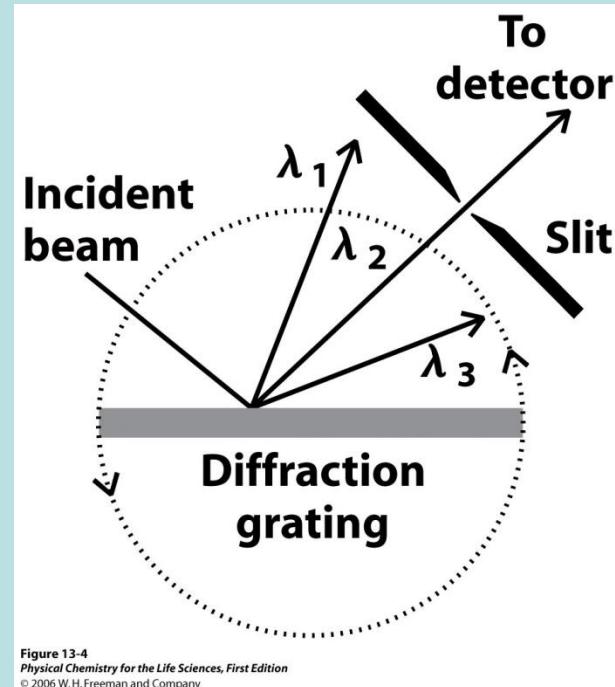


Figure 13-4  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Fontes e detectores

- Infravermelho:  
técnicas de  
transformado Fourier
  - Interferómetro de  
Michelson
- Sensibilidade mais  
elevada

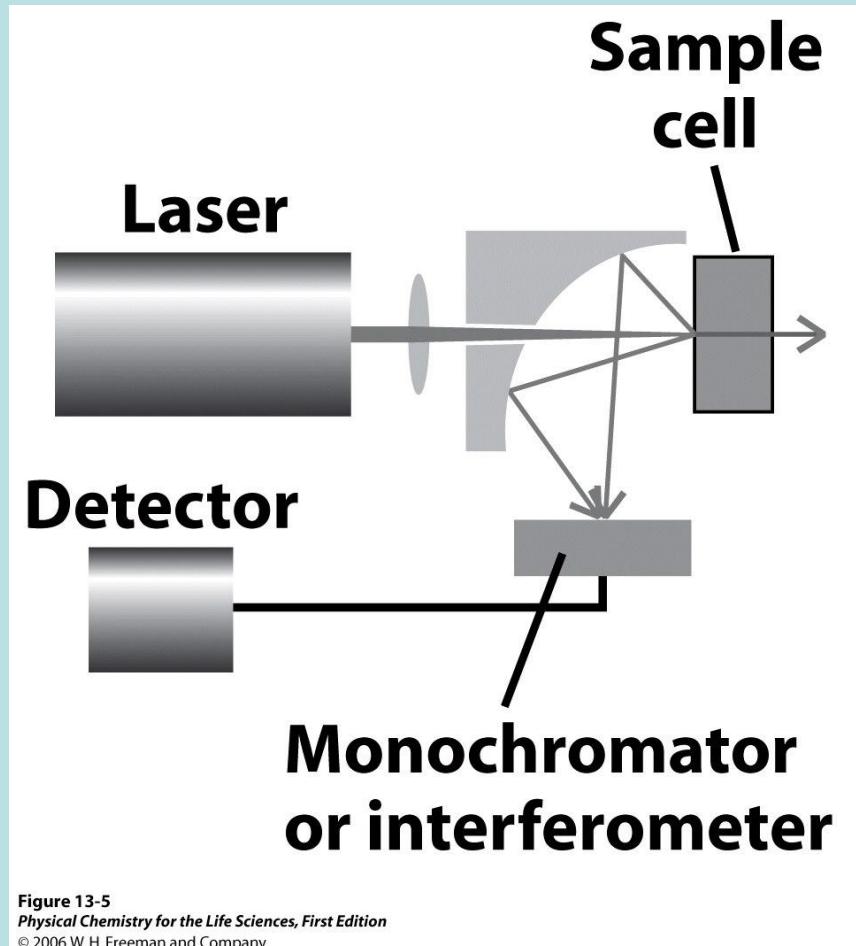


Figure 13-5  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Fontes e detectores

- Um único elemento sensitivo ou uma matriz 1D ou 2D
  - Fotodíodos
  - CCDs
  - Infravermelho: detector Hg-Cd-Te (MCT) – detector fotovoltaico
- Espectrómetros Raman
  - Laser (fonte)
  - Radiação espalhada (1 fotão em  $10^7$ )
  - Bandas Stokes (fotão deu parte de energia a molécula)
  - Bandas anti-Stokes (fotão recebeu parte de energia da molécula)
  - Filtros, redes de difracção, interferómetros de Michelson

# Análise biosensorial

- Mede-se cinética e termodinâmica de interacções entre polímeros
- O biosensor detecta as alterações das propriedades ópticas da superfície em contacto com o biopolímero
- Oscilações da densidade electrónica em metais excitados pela luz – plasmons
  - Ressonância de plasmons na superfície
  - Variando o material em contacto com a superfície, varia o ângulo de ressonância
- Estudar ligação de moléculas ao material colocado na superfície: ADN – proteínas, anticorpo-antígeno

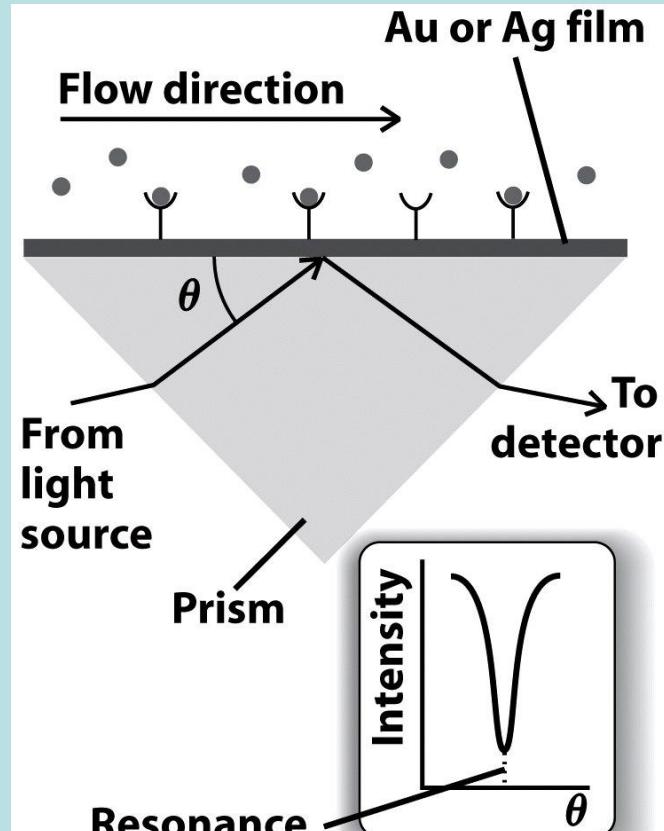


Figure 13-6  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Intensidade de transições

- Espectroscopia de absorção
- Lei de Lambert-Beer
- $\epsilon$  (L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon [J] l$$

$$I = I_0 10^{-\epsilon [J] l}$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$

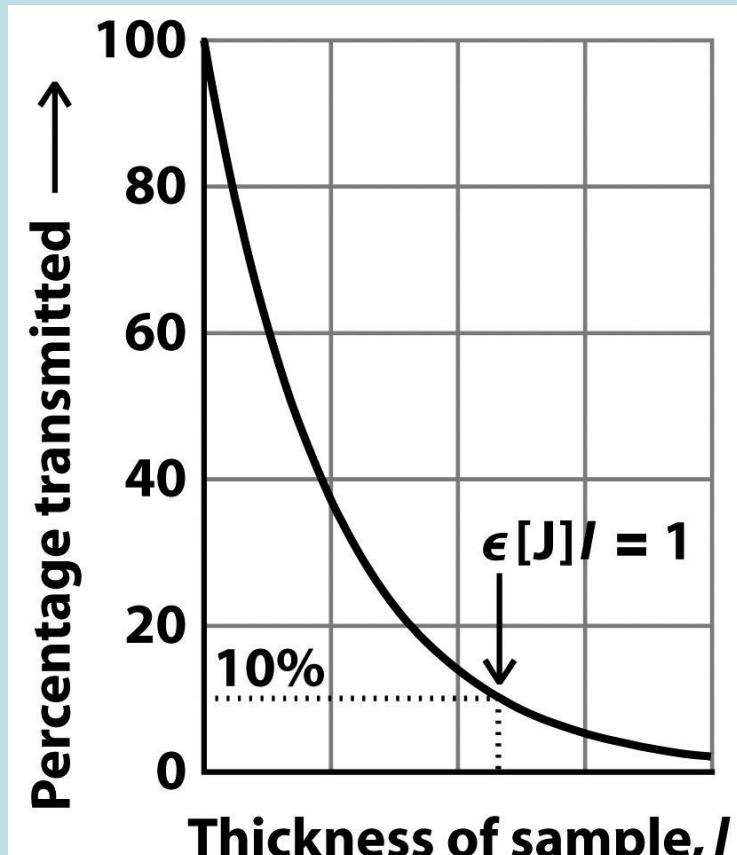


Figure 13-7  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Dedução

$$dI = -\kappa[J]Idx \quad ***$$

$$\frac{dI}{I} = -\kappa[J]dx$$

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\kappa \int_0^l [J]dx$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\kappa[J]l$$

$$\ln x = \ln 10 \times \log x \quad \Rightarrow \quad \varepsilon = \kappa / \ln 10$$

$$\log \frac{I}{I_0} = -\varepsilon[J]l \quad A = \log \frac{I_0}{I} = -\log \frac{I}{I_0}$$

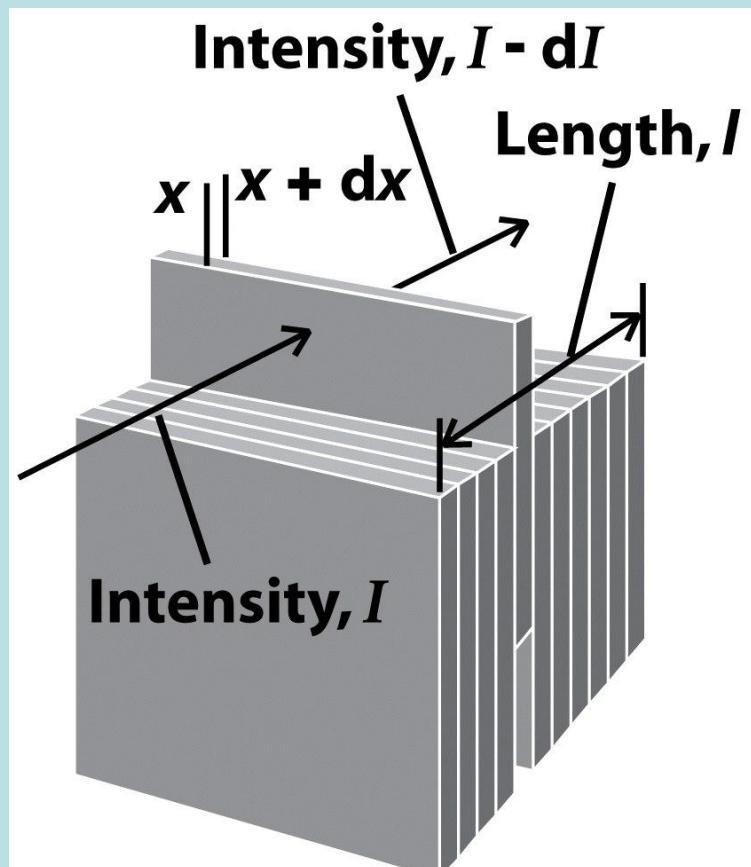


Figure 13-8  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Exemplo: $\varepsilon$ do triptofano

- Radiação, c.d.o.=280 nm;  
Célula 1 mm;  
0,50 mmol L<sup>-1</sup> triptófano;  
 $T = 0,54$ ;  
Calcular:  $A$  e  $\varepsilon$  aos 280 nm, e  $T$  para  $l = 2,0$  mm

*R.:*

$$\varepsilon = -\frac{\log T}{[J]l} = 5,4 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$$

$$A = -\log 0,54 = 0,27$$

$$T(2,0 \text{ mm}) = 0,29 = 10^{-(2 \times 0,27)}$$

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon [J]l$$

$$I = I_0 10^{-\varepsilon [J]l}$$

$$T = \frac{I}{I_0}$$

# Exemplo

- $C = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$   
triptófano;  
 $T = 0,14$ ;  
c.d.o.=240 nm;  
Célula  $l = 5,0 \text{ mm}$ ;

Calcular:  $\varepsilon$ ,  $A$  e  
 $T(1,0\text{mm})$

*R.:*

$$\varepsilon = -\frac{\log T}{[J]l} = 1,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$$

$$A = -\log 0,14 = 0,85 \text{ *}$$

Cálculo aproximado

$$-\left[\log(1+0,4) - \log 10\right] = -\left[\log(1+0,4) - \log 10\right] =$$

$$-\left[\frac{\ln(1+0,4)}{\ln 10} - \log 10\right] \approx -\left[\frac{0,4}{2,3} - 1\right] \approx 1 - 0,20 = 0,80$$

$$T(1,0 \text{ mm}) = 10^{-(0,85/5)} = 0,68$$

# Fórmulas de cálculo aproximado

$$\ln(1+x) \approx x, \quad x \ll 1$$

$$e^x \approx 1+x, \quad x \ll 1$$

$$(1+x)^k \approx 1+kx, \quad kx \ll 1$$

$$(1+x)^{1/k} \approx 1+\cancel{x/k}, \quad kx \ll 1$$

$$(1+x)^{1/2} = \sqrt{1+x} \approx 1+\cancel{x/2}$$

$$\frac{1}{1+x} \approx 1-x, \quad x \ll 1$$

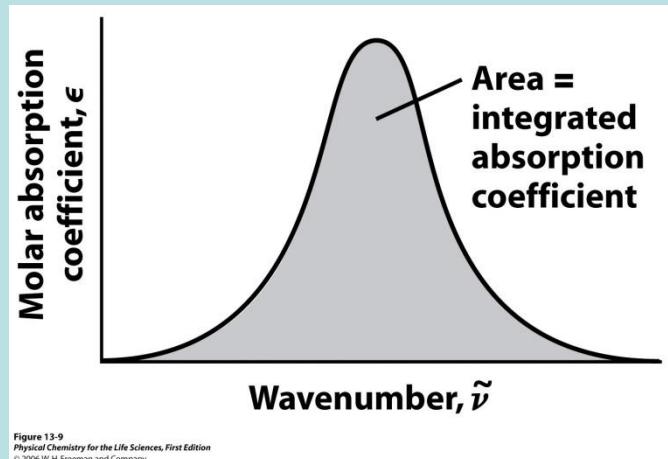
$$\ln 10 = 2,303$$

$$a^x \approx 1+x \ln a, \quad ax \ll 1$$

$$10^x \approx 1+2,303x \approx 1+2x, \quad 2x \ll 1$$

# Intensidade de transições

- Coeficiente de absorção integrado (vs  $\epsilon$ , para avaliar a intensidade de uma transição)
- Momento dipolar da transição



$$\vec{\mu}_{\text{fi}} = \int \psi_{\text{f}}^* \vec{\mu} \psi_{\text{i}} \, d\tau$$

$$\mu_x = -ex$$

$$\mu_{x,\text{fi}} = -e \int \psi_{\text{f}}^* \mu_x \psi_{\text{i}} \, d\tau$$

# Intensidade de transições

- Momento dipolar da transição

$$\vec{\mu}_{fi} = \int \psi_f^* \vec{\mu} \psi_i \, d\tau$$

átomo tipo H :

$$\mu_x = -ex$$

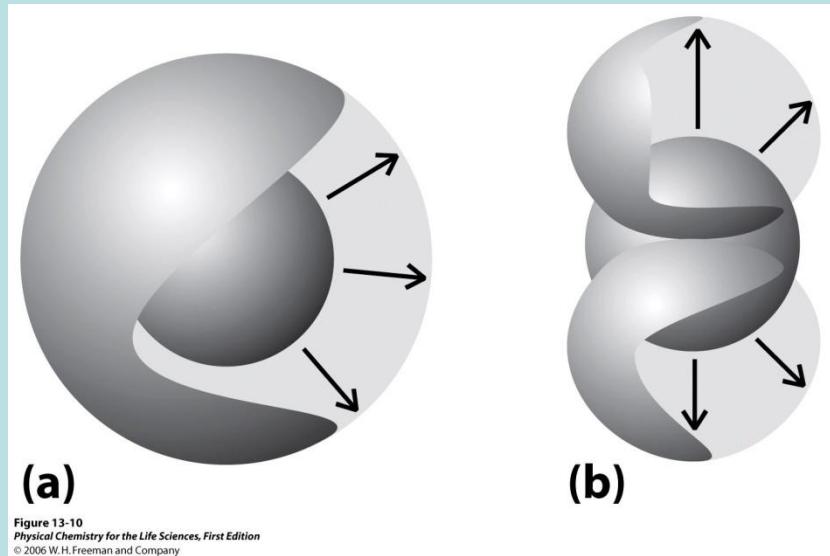
$$\mu_{x,fi} = -e \int \psi_f^* \mu_x \psi_i \, d\tau$$

geral :

$$\vec{\mu} = -e \sum_i \vec{r}_i + e \sum_I Z_I \vec{R}_I$$

# Regras de selecção

- Regra geral de selecção
- Regras específicas (alterações de números quânticos)
- Transições *permitidas* e *proibidas*
- Transições tipo dipolo eléctrico: a redistribuição da carga deve ser dipolar;
- A intensidade é proporcional ao número de moléculas no estado inicial, e à força da transição



$$\propto \vec{\mu}_{fi}^2$$

# Largura da linha de emissão

- Os estados excitados têm um certo tempo de vida
- Mecanismos:
  - Desactivação por colisões
  - Emissão espontânea: proporcional a  $\nu^3$ 
    - A largura natural das transições electrónicas é muito maior que a das vibracionais;
    - Valor típico:  $10^{-8}$  s  $\rightarrow 5 \times 10^{-4}$  cm $^{-1}$

decaimento :  $\propto e^{-t/\tau}$

$$\delta E \approx \frac{\hbar}{\tau}$$

$$\delta E = hc \delta \tilde{\nu}$$

$$\delta \tilde{\nu} = \frac{5,3 \text{ cm}^{-1}}{\tau/\text{ps}}$$

$$\delta E_{\text{col}} \approx \hbar / \tau_{\text{col}}$$

# Espectros vibracionais

- Moléculas diatómicas:  
1 modo vibracional
- Junto ao mínimo:  
 $V = \frac{1}{2}k(R - R_e)^2$

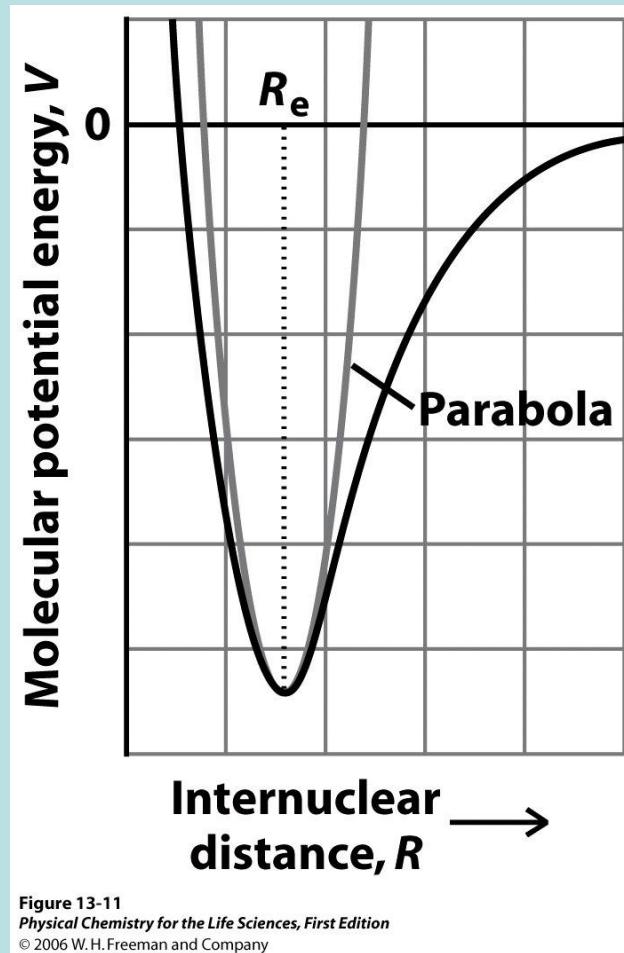


Figure 13-11  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Espectro vibracional: oscilador harmónico

- Junto ao mínimo:

$$V = \frac{1}{2}k(R - R_e)^2$$

$$E_v = (v + 1/2)h\nu \quad v = 0, 1, 2, \dots$$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left( \frac{k}{\mu} \right)^{1/2} \quad \mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

$v$  – número quântico vibracional

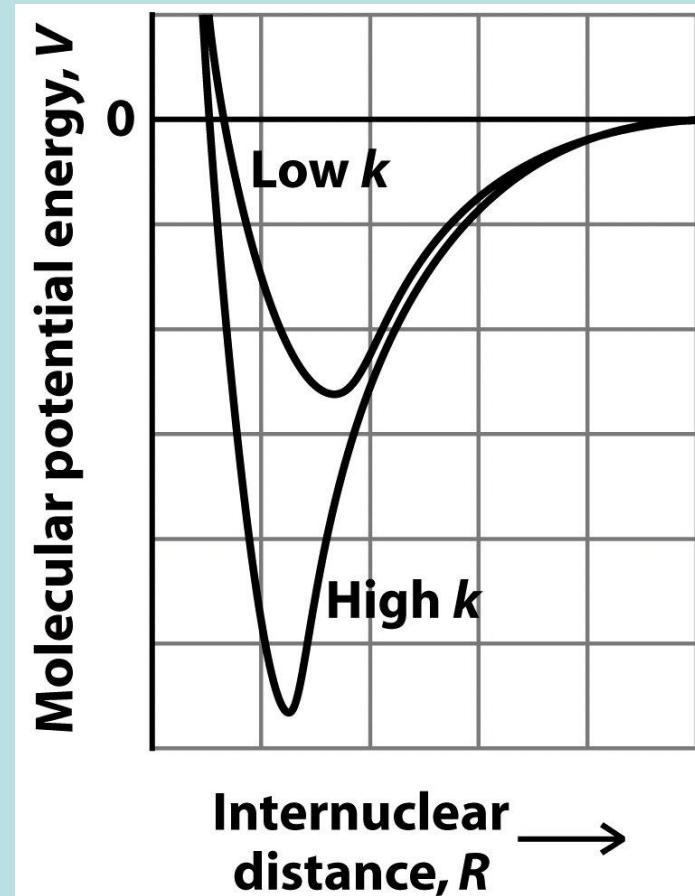


Figure 13-12  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Exemplo

- Monóxido de carbono;  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ ;  $k = 1860 \text{ Nm}^{-1}$
- Calcular  $\nu$  e a separação entre os estados
- R:  $\nu = 64,32 \text{ THz}$   
 $E = 42,62 \text{ zJ}$ ;  
 $1 \text{ zJ} = 10^{-21} \text{ J}$

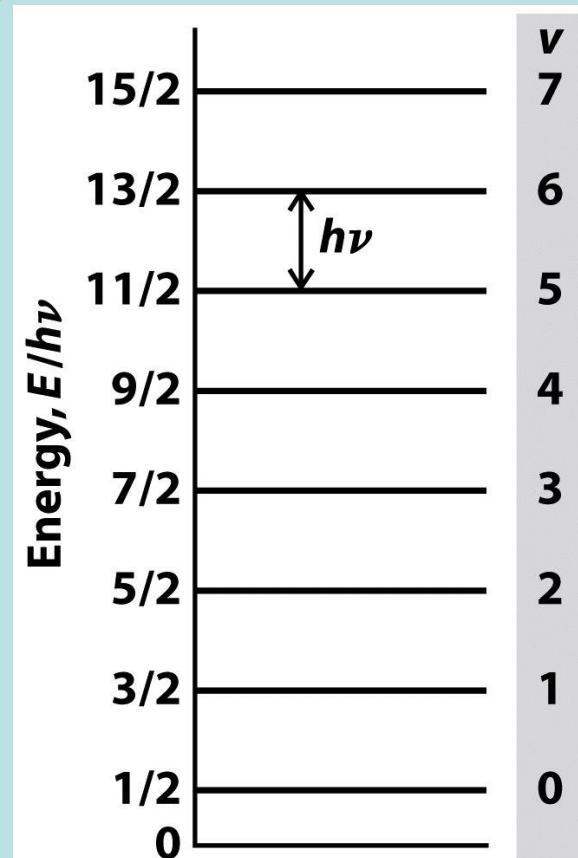


Figure 13-13  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
 © 2006 W. H. Freeman and Company

# Massas isotópicas

$^{12}\text{C}$	12.000 000 0(0)*
$^{13}\text{C}$	13.003 354 8378(10)
C	12.010 7(8)
$^1\text{H}$	1.00782 5032 1(4)
$^2\text{H}$	2.01410 1778 0(4)
H	1.00794 (7)
$^{16}\text{O}$	15.9949 1463 (5)
$^{17}\text{O}$	16.9991 312 (4)
$^{18}\text{O}$	17.9991 603 (9)
O	15.9994 (3)
	<a href="http://www.webelements.com/">http://www.webelements.com/</a>

# Exemplo

- Substituição isotópica;

$$\nu(^{16}\text{O}_2) = 47,37 \text{ THz}$$

$$\nu(^{18}\text{O}_2) - ?$$

$$\frac{\nu(^{18}\text{O}_2)}{\nu(^{16}\text{O}_2)} = \sqrt{\frac{16,00}{18,00}} \quad \nu(^{18}\text{O}_2) = \sqrt{\frac{16,00}{18,00}} \times 47,37 \text{ THz} = 44,53 \text{ THz}$$

# Transições vibracionais

- Energias  $10^{-20} - 10^{-19}$  J
- Frequências  $10^{13} - 10^{14}$  Hz
- Números de onda: 300 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  (infravermelho, MIR)
- Regra geral de selecção: a vibração deve alterar o momento eléctrico dipolar
- Molécula diatómica homonuclear: inactiva no IV

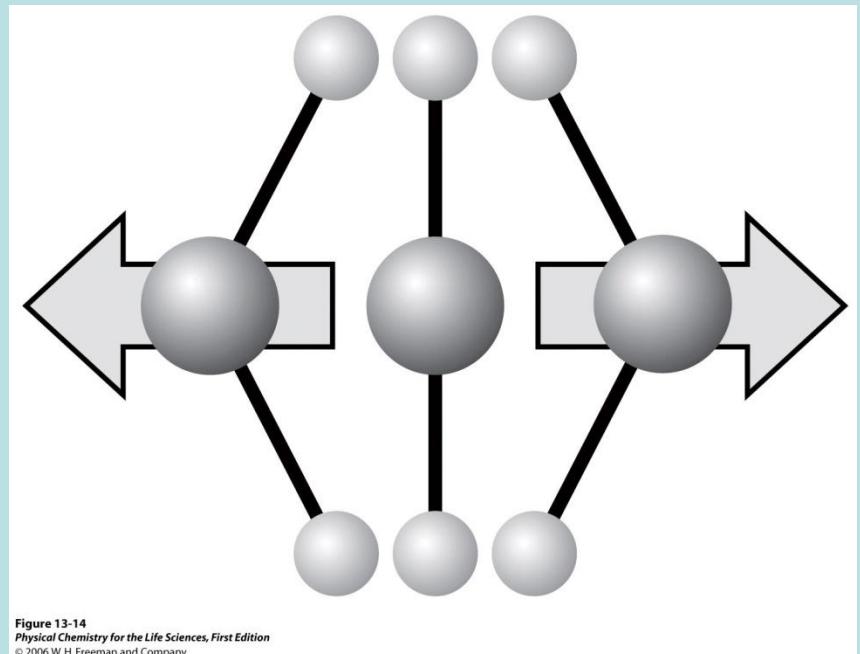


Figure 13-14  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Exemplos

- Quais das seguintes moléculas podem contribuir para o aquecimento global (efeito de estufa), absorvendo os raios IV:  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ?
- Serão activos no IV as moléculas  $CH_2=CH_2$  e  $NO$ ?

# Transições vibracionais

- **Regra específica** de selecção:  
 $\Delta\nu = \pm 1$ ;
- Isso corresponde a  
 $\Delta E = h\nu$
- A temperatura de ambiente, na maioria dos casos  $\nu = 0$  – a molécula está no estado fundamental

- Exemplo: CO em peptide:  
 $k = 1,2 \text{ kN m}^{-1}$   
Número de onda?
- $R: 1,7 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$



$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left( \frac{k}{\mu} \right)^{1/2} \quad c = \lambda\nu$$

$$\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \lambda^{-1} = \frac{\nu}{c/(\text{cm/s})}$$

# Potencial real

- Movimento anarmónico
  - Os níveis tornam-se mais próximos
  - Existem em número finito
    - C–H – 5
    - I–I – ca. 60
  - Sobretons
    - $\Delta\nu = +2; +3$  etc.

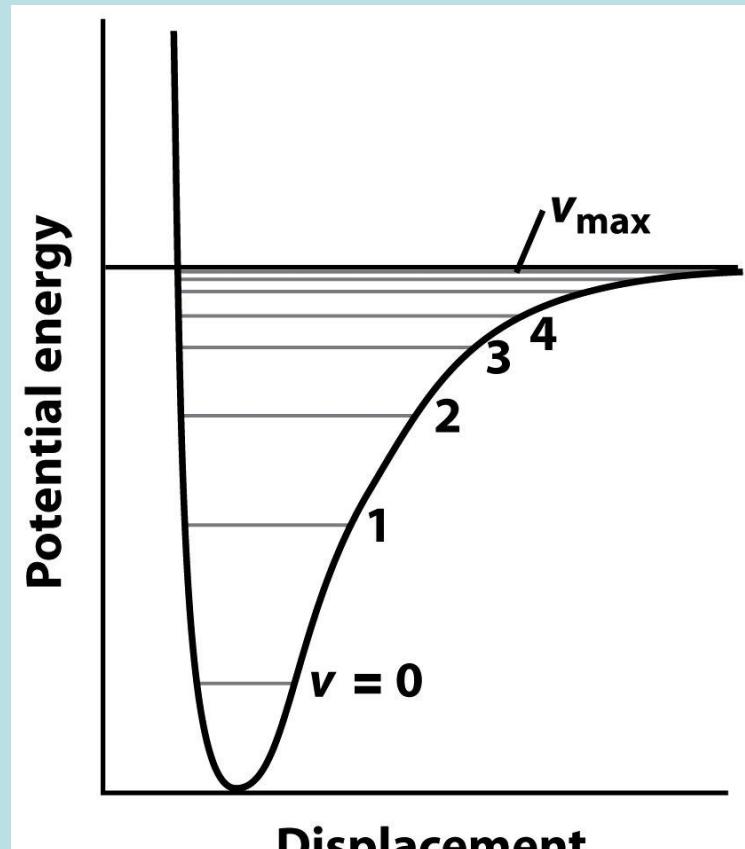


Figure 13-15  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Espectroscopia vibracional de Raman

- **Regra geral:** a polarizabilidade da molécula deve ser alterada pela vibração
- **Regra específica** de selecção  $\Delta\nu = \pm 1$
- Linhas Stokes:  $\Delta\nu = +1$  – mais intensas
- Linhas anti-Stokes:  $\Delta\nu = -1$
- Diatómicas – todas activas

# Vibrações em moléculas poliatómicas

- Número de modos vibracionais
  - Não lineares:  
 $N.m.v. = 3N - 6$
  - Lineares:  
 $N.m.v. = 3N - 5$

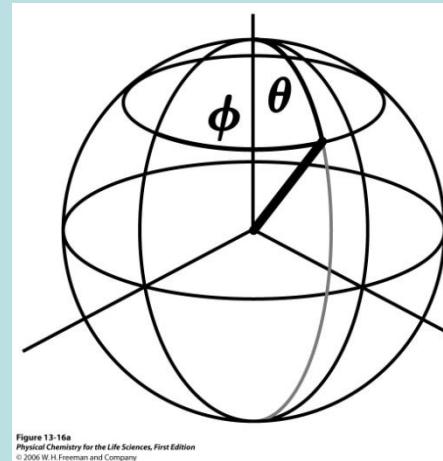


Figure 13-16a  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

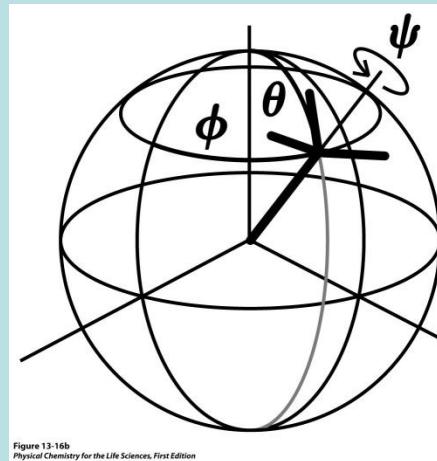


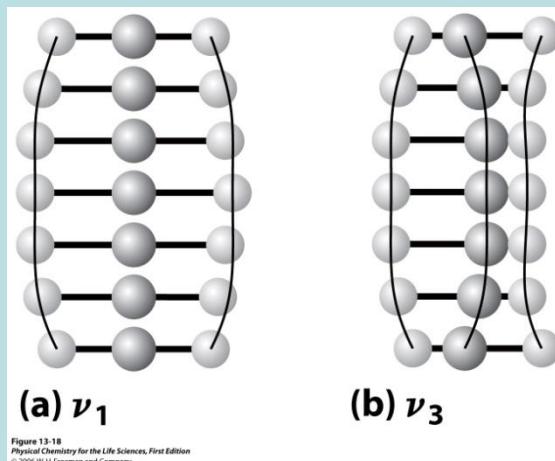
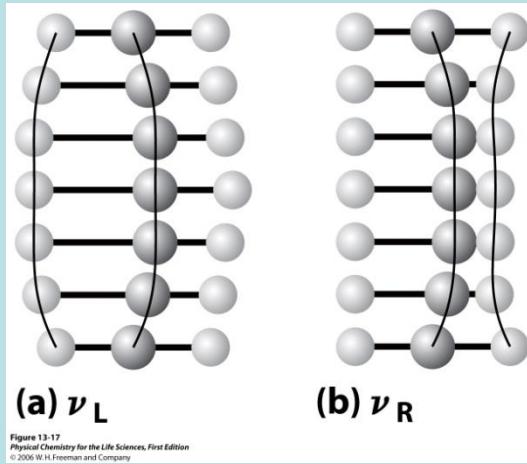
Figure 13-16b  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Vibrações em moléculas poliatómicas

- Número de modos vibracionais
  - Não lineares:  $N.m.v.= 3N - 6$
  - Lineares:  $N.m.v.= 3N - 5$
- Exemplos
  - $\text{H}_2\text{O}$   $N=3$  n.m.v.=3
  - Naftaleno  $\text{C}_{10}\text{H}_8$   $N=18$  n.m.v.=48
  - $N=2$  n.m.v.=1
  - $\text{CO}_2$   $N=3$  n.m.v.=4
  - $\text{HCCH}$  (etino) n.m.v.?
  - Proteína de 4000 átomos?

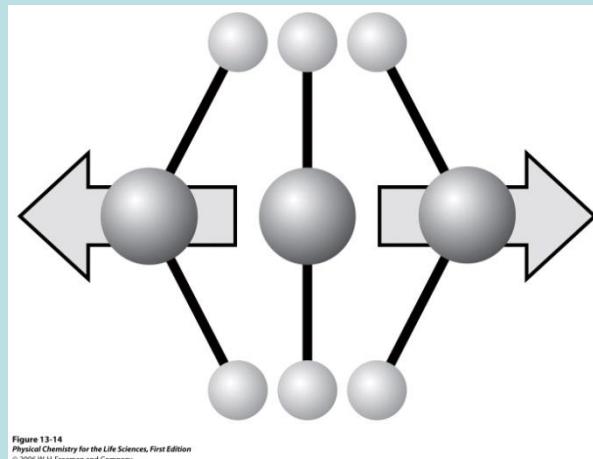
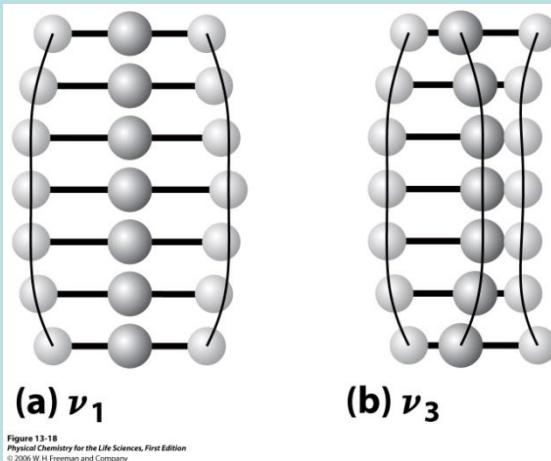
# Vibrações em moléculas poliatómicas

- Modos L e R são dependentes
- Modos 1 e 2 – modos normais – são independentes
- Modos normais: deslocações vibracionais colectivas e independentes
- Modos de alongamento têm frequências mais elevadas comparando com as de flexão



# Vibrações em moléculas poliatómicas

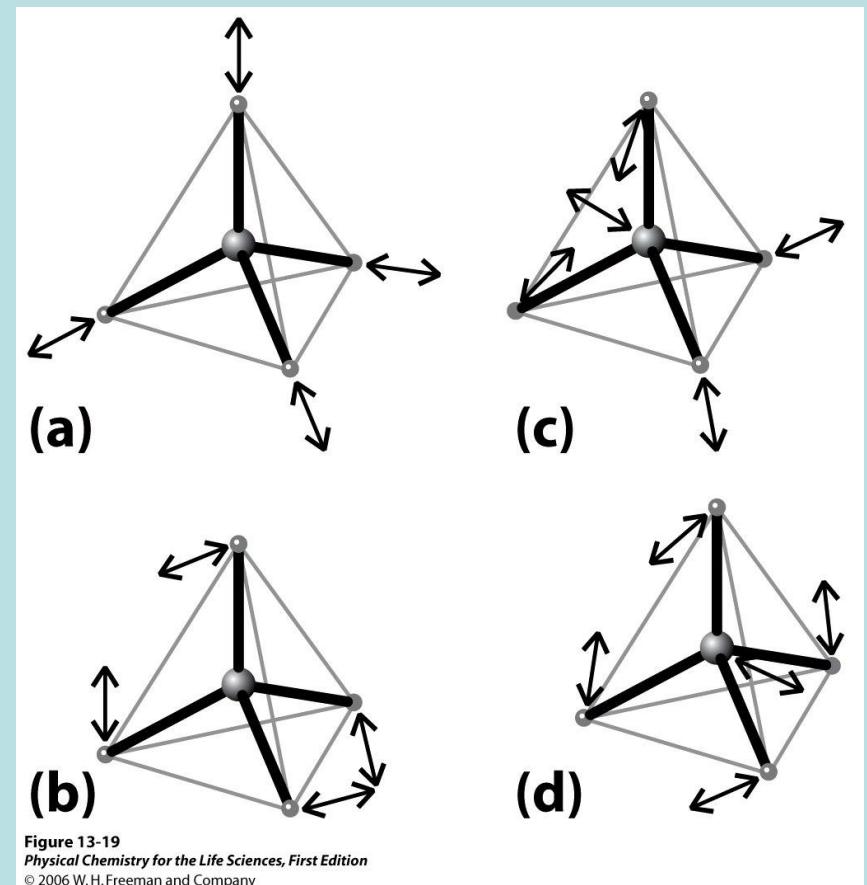
- Regra geral: os deslocamentos correspondentes ao modo normal devem alterar o momento dipolar
- $\text{CO}_2$



# Vibrações em moléculas poliatómicas

## Exemplos

- Qual a diferença entre o espectro IV de  $\text{N}_2\text{O}$  e de  $\text{CO}_2$ ?
- $\text{CH}_4$ : quais dos modos são activos em IV?



# Modos normais

- Alguns modos podem ser atribuídos aos grupos funcionais
- Outros – movimentos colectivos da molécula inteira; abaixo dos  $1500\text{ cm}^{-1}$  (zona das impressões digitais)

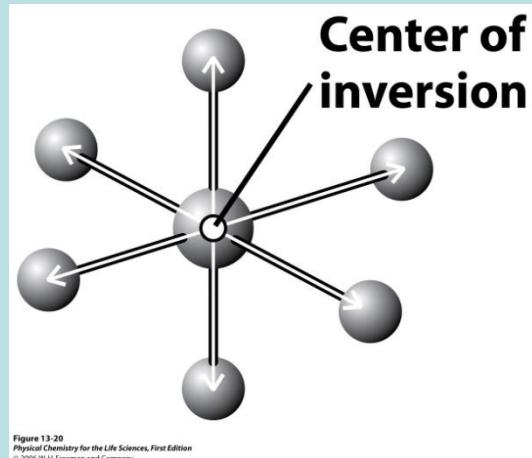
**Table 13.1 Typical vibrational wavenumbers**

Vibration type	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$
C H	2850–2960
C H	1340–1465
C C stretch, bend	700–1250
C C stretch	1620–1680
C C stretch	2100–2260
O H stretch	3590–3650
C O stretch	1640–1780
C N stretch	2215–2275
N H stretch	3200–3500
Hydrogen bonds	3200–3570

Table 13-1  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

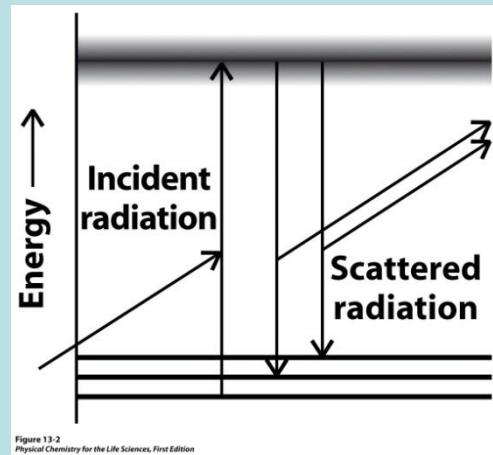
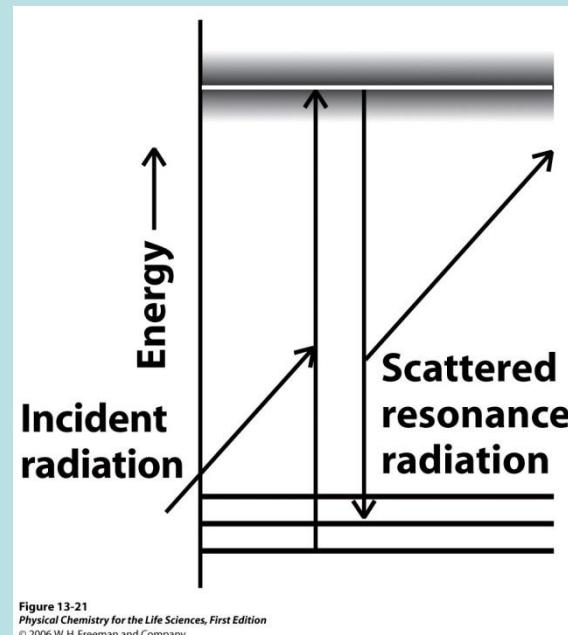
# Moléculas poliatómicas: espectros de Raman

- **Regra geral:** vibração no modo normal está acompanhada pela variação da polizabilidade
- **Regra de exclusão:** em moléculas com centro de inversão nenhum modo pode ser activo tanto em IR como em Raman
- Exemplo:
  - Apenas o modo de alongamento simétrico em  $\text{CO}_2$ 
    - podemos confirmar pela regra de exclusão



# Espectros Raman de ressonância

- Maior intensidade do espectro
- Espectro simplificado



# Exemplo: espectroscopia vibracional de proteínas

- Espectro de  $-\text{CONH}-$  comparando com N-metilacetamida  $\text{CH}_3\text{CONHCH}_3$
- (a) (*ordem crescente n.d.o.*)
  - CH ( $\text{CCH}_3$ ) s e a;
  - CH ( $\text{NCH}_3$ ) s e a;
  - NH
- (b) amida I
  - CO – 1640-1670  $\text{cm}^{-1}$
- (c) amida II
  - CO (along.) + NH (flexão) – 1620-1650  $\text{cm}^{-1}$

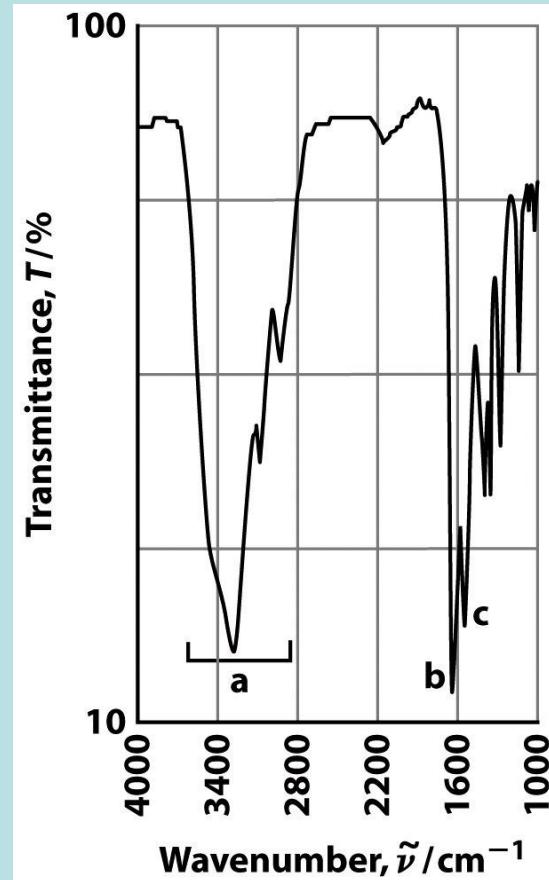
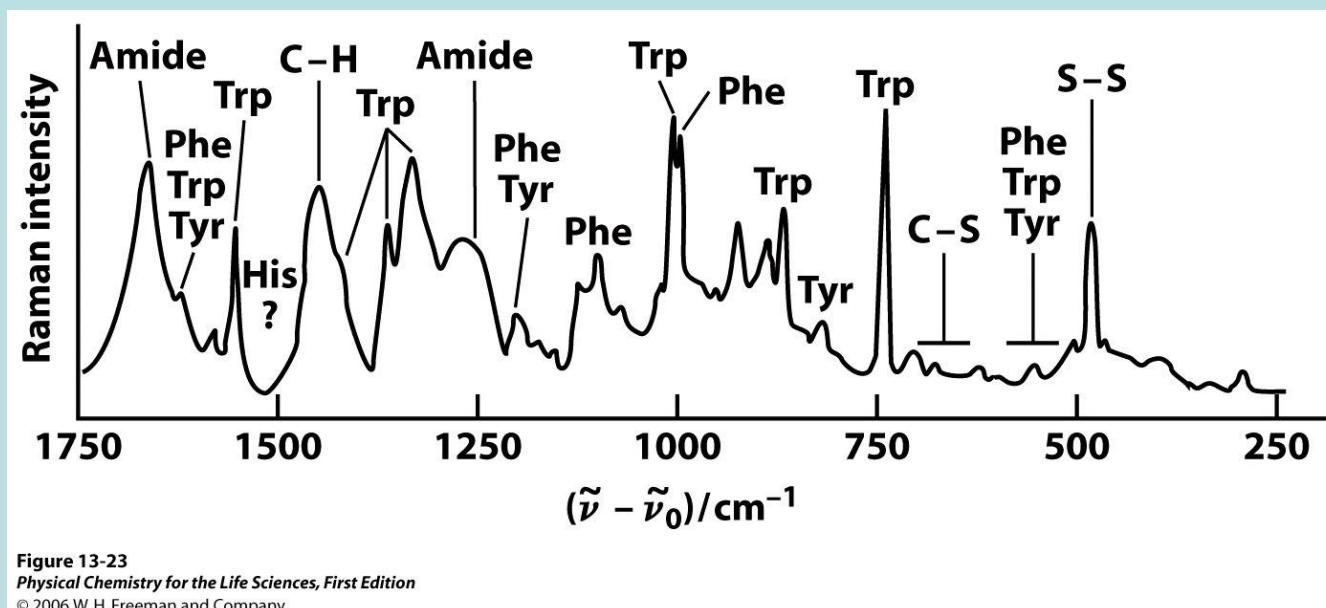


Figure 13-22  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W. H. Freeman and Company

# Exemplo: espectroscopia vibracional de proteínas

- Algumas bandas – dos grupos laterais
- Amida I e amida II – são sensíveis aos pontos de hidrogénio; amida I  $\rightarrow$  para n.d.o. +baixos; N–H $\cdots$ O=C; amida II  $\rightarrow$  para n.d.o. +elevados



# Exemplo: espectroscopia vibracional de proteínas

- Podemos observar alterações de conformação

**Table 13.2 Typical vibrational wavenumbers for the amide I and II bands in polypeptides**

Vibration type	$\alpha$ Helix	Vibrational wavenumber ( $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$ ) for $\beta$ Sheet	Random coil
Amide I	1653	1640	1656
Amide II	1545	1525	1535

Table 13-2  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Exemplo: espectroscopia vibracional de proteínas

- Espectros Raman de ressonância: selectivamente observar bandas de pigmentos ligados a um proteína
  - (a) 407 nm – clorofila a e  $\beta$ -caroteno
  - (b) 488 nm –  $\beta$ -caroteno
  - A parte restante da molécula e o solvente não absorvem a estes c.d.o.

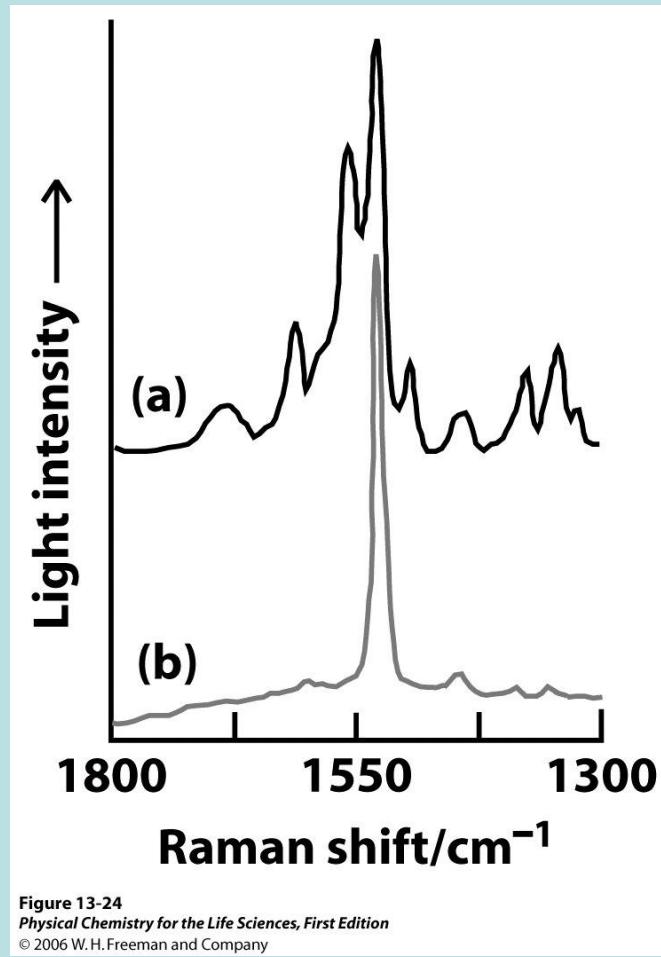


Figure 13-24  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H.Freeman and Company

# Microscopia vibracional

- Limite da resolução;  $n_r$  – índice de refracção do material da lente;  $a$  – abertura numérica
- Áreas até  $9 \mu\text{m}^2$  – necessidade de fontes de radiação muito intensas

$$r_{\text{Airy}} = 0,61 \frac{\lambda}{a} \quad a = n_r \sin \alpha$$

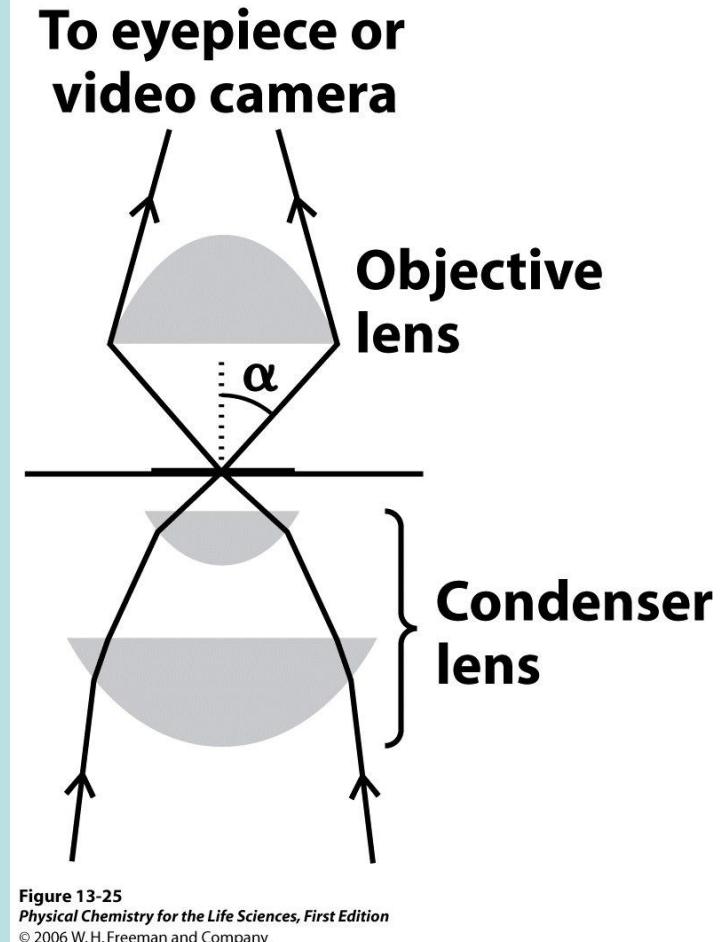
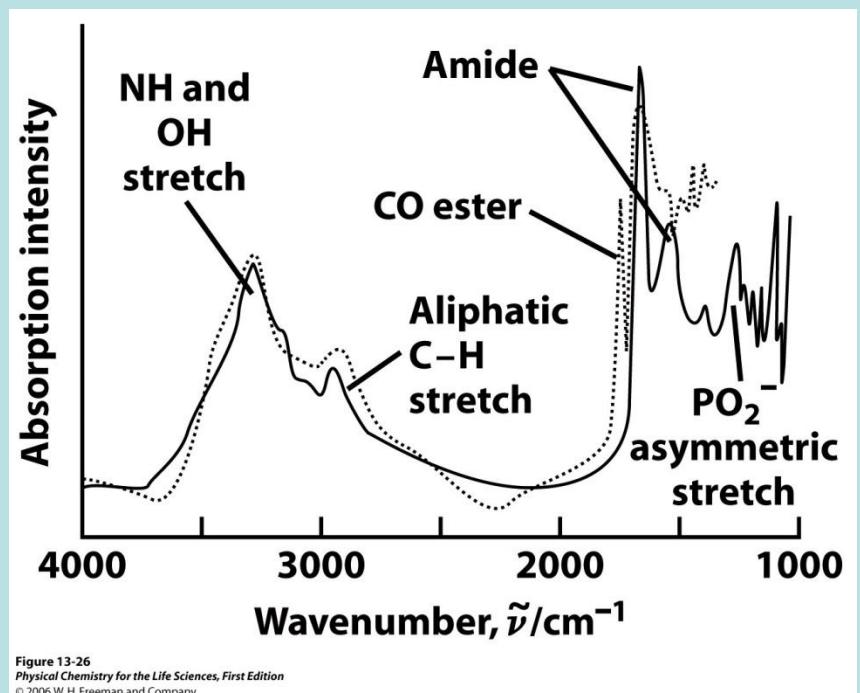


Figure 13-25  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Microscopia vibracional

- Imagens de Raman
- Espectrómetros de FTIR
- Exemplo: célula viva (—) vs célula a morrer (...)
  - 1545 e 1650  $\text{cm}^{-1}$  – CO peptídico
  - 1240  $\text{cm}^{-1}$  – grupo  $-\text{PO}_2^-$  de lípidos
  - 1730  $\text{cm}^{-1}$  – CO éster
  - Distribuição de proteínas e lípidos na célula



# Espectros UV e visível

**Table 13.3 Color, frequency, and energy of light**

Color	$\lambda/\text{nm}$	$\nu/(10^{14} \text{ Hz})$	$\tilde{\nu}/(10^4 \text{ cm}^{-1})$	$E/\text{eV}$	$E/(\text{kJ mol}^{-1})$
Infrared	1000	3.00	1.00	1.24	120
Red	700	4.28	1.43	1.77	171
Orange	620	4.84	1.61	2.00	193
Yellow	580	5.17	1.72	2.14	206
Green	530	5.66	1.89	2.34	226
Blue	470	6.38	2.13	2.64	254
Violet	420	7.14	2.38	2.95	285
Near ultraviolet	300	10.0	3.3	4.15	400
Far ultraviolet	200	15.0	5.00	6.20	598

Table 13-3  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

3,0

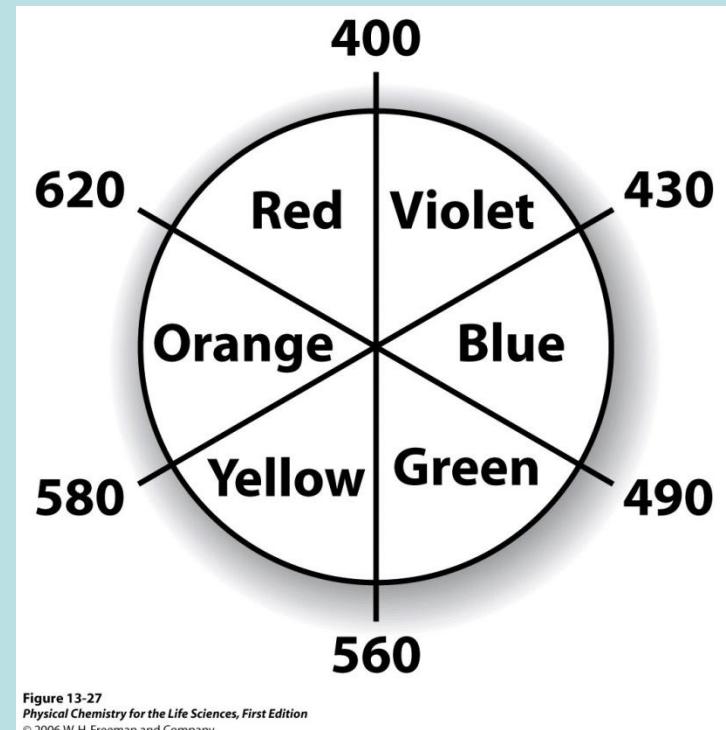
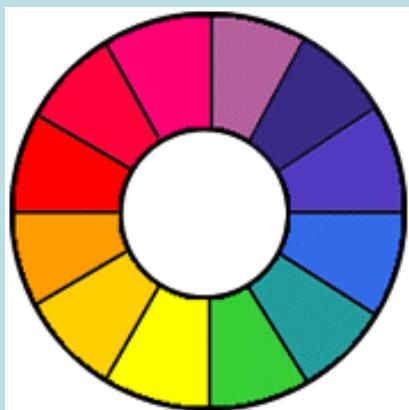
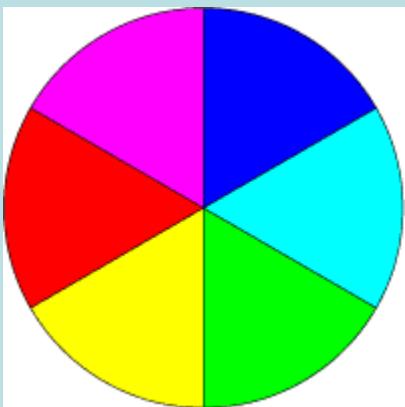
96,47

x100; -3,5%

$$e = 1,602\ 176\ 487(40) \times 10^{-19} \text{ C}$$

$$N_A = 6,022\ 141\ 79(30) \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

# Roda de cores do pintor



# Espectros UV e visível

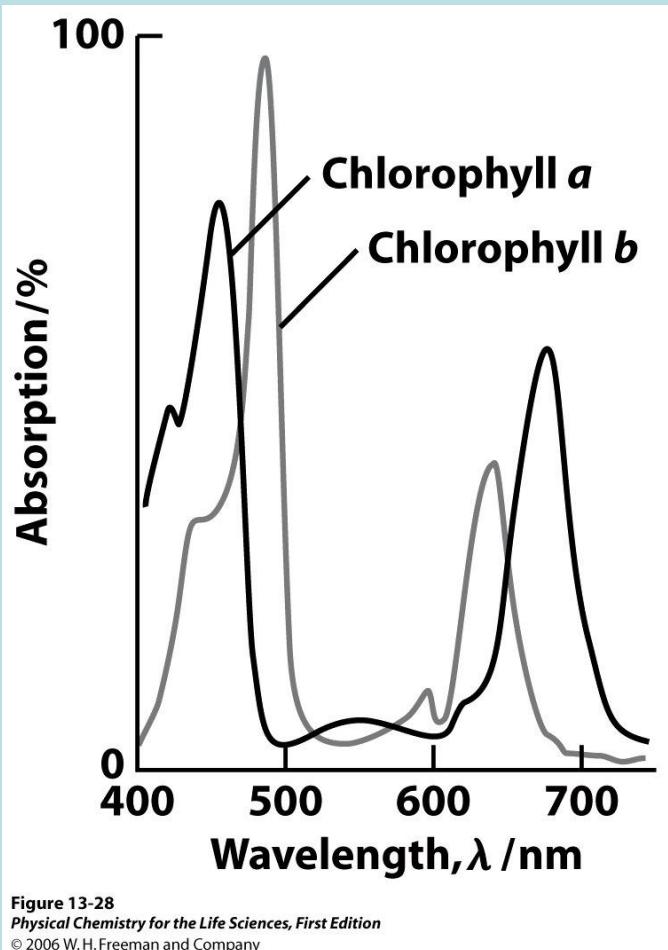


Figure 13-28  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

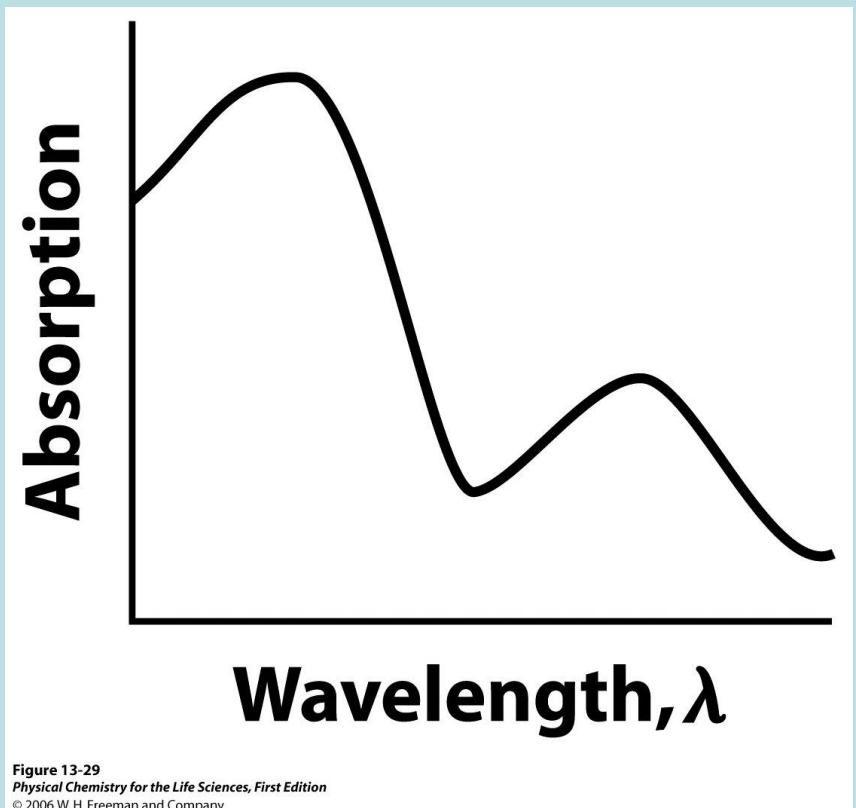
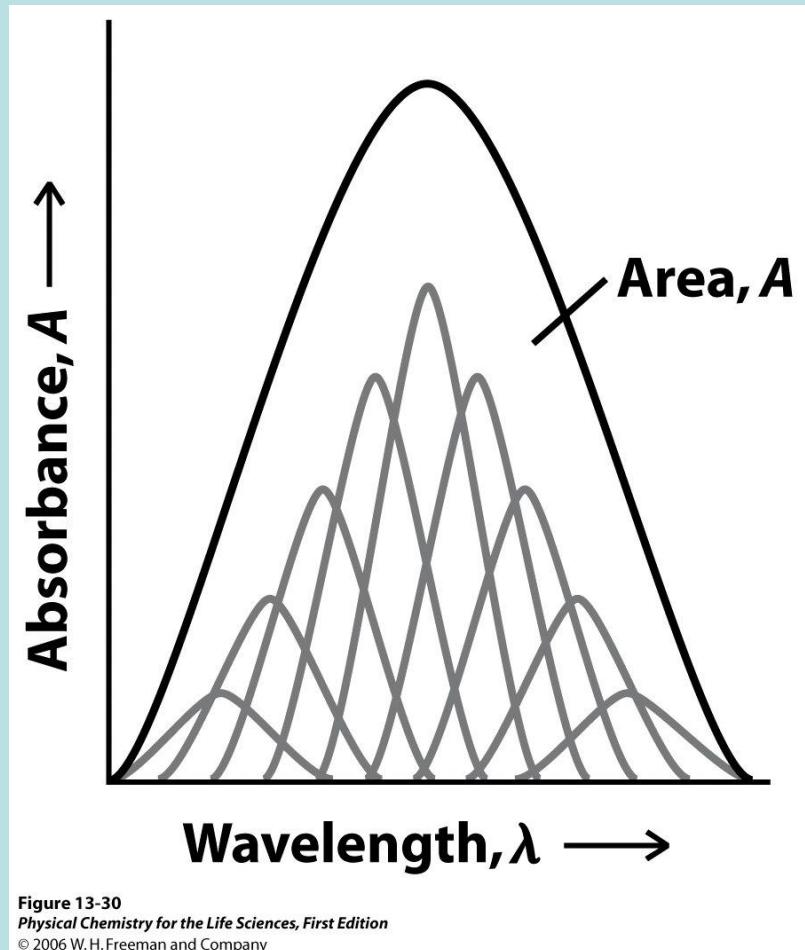


Figure 13-29  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Princípio de Franck-Condon

- As transições electrónicas acontecem muito mais rapidamente que os núcleos conseguem reagir, sendo muito mais pesados que os electrões.
- Estrutura vibracional de uma banda.



# Princípio de Franck-Condon

- A transição acontece para um estado vibracionalmente excitado:
  - Núcleos parados correspondem a um desvio máximo do equilíbrio.

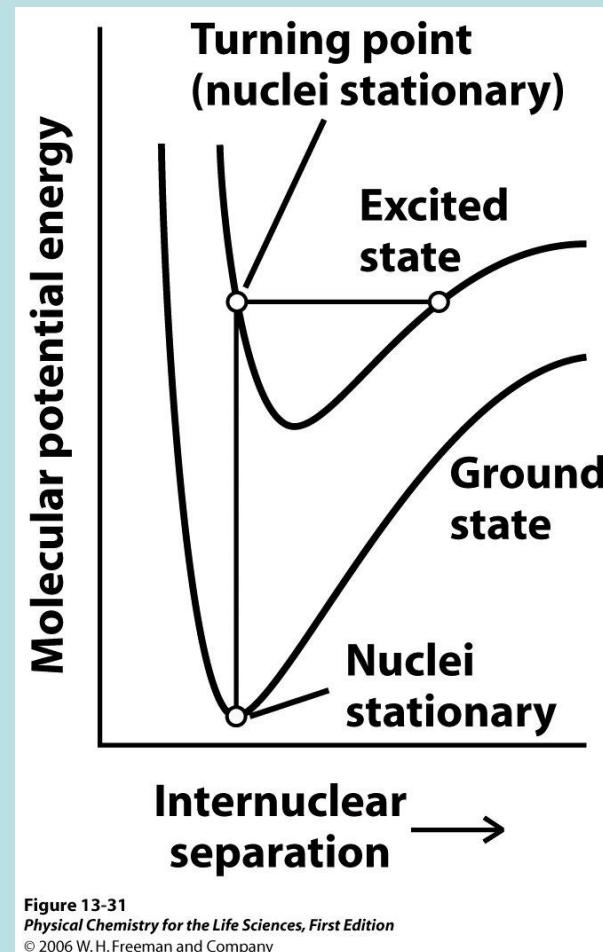


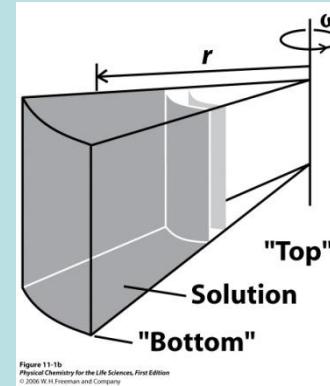
Figure 13-31  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
 © 2006 W.H. Freeman and Company

# Correcção (Cap. 11)

# Massa molar

$$M = \frac{SRT}{bD}$$

$$b = 1 - \rho v_s$$



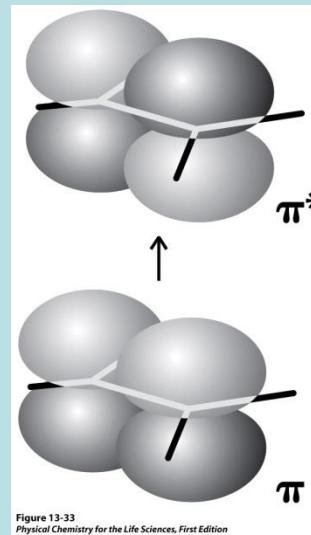
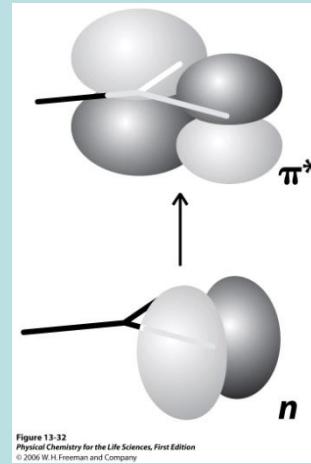
$v_s$  – volume específico do soluto;  $\text{cm}^3/\text{g}$

$\rho$  – densidade do solvente;  $\text{g}/\text{cm}^3$

- Para saber a massa molar  $M$ , basta determinar  $S$  e  $D$ , medindo sedimentação e difusão

# Absorção electrónica de moléculas biológicas

- Grupos cromóforos
  - 290 nm: CO (transição  $n-\pi^*$ ; ca. 4eV)
  - Transições *d-d* (complexos); Ex.:  $\text{Cu}^{2+}$  500 – 700 nm (azurina)
  - Transições c/transferência de carga ( $\text{M} \rightarrow \text{L}$  ou vice versa)
  - Ligações duplas  $\text{C}=\text{C}$  (transição  $\pi-\pi^*$ ; ca. 7eV, UV); Conjugadas → vis; Ex.: caroteno



# Espectroscopia electrónica: instrumento bioquímico

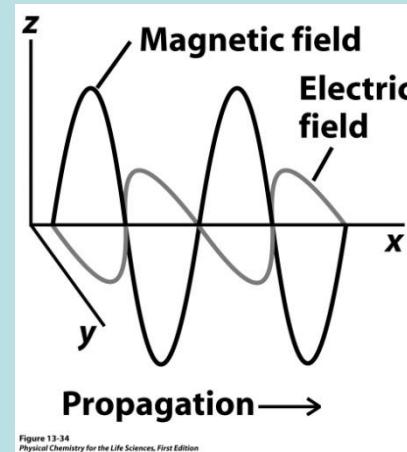
- As posições e as intensidades são sensíveis às interacções intermoleculares

**Table 13.4 Electronic absorption properties of amino acids, purine, and pyrimidine bases in water at pH = 7**

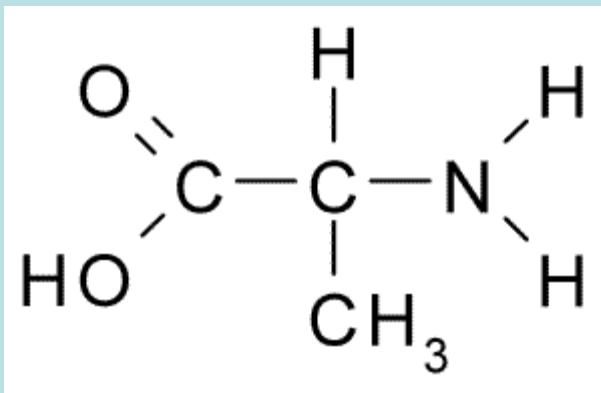
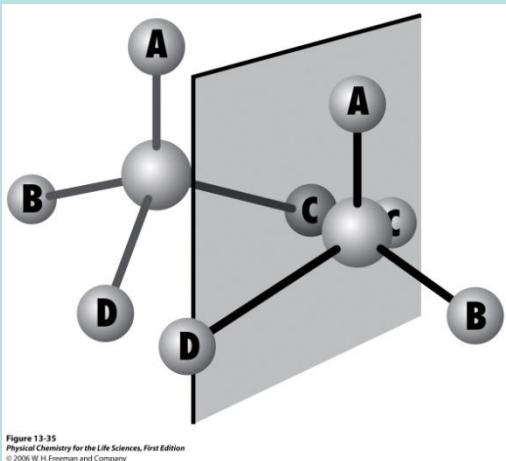
Compound	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\varepsilon_{\text{max}}/(10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
Tryptophan	280	5.6
Tyrosine	274	1.4
Phenylalanine	257	0.2
Adenine	260	13.4
Guanine	275	8.1
Cytosine	267	6.1
Uracil	260	9.5

# Exemplo

- Espectro de espiral  $\alpha$  tem duas transições  $\pi-\pi^*$  em vez de uma: acomplamento exitónico (dois estados excitados diferentes em vez de um)
- Pormenores adicionais: polarização da luz;
  - Polarização plana
  - Polarização circular
  - Actividade óptica: moléculas quirais

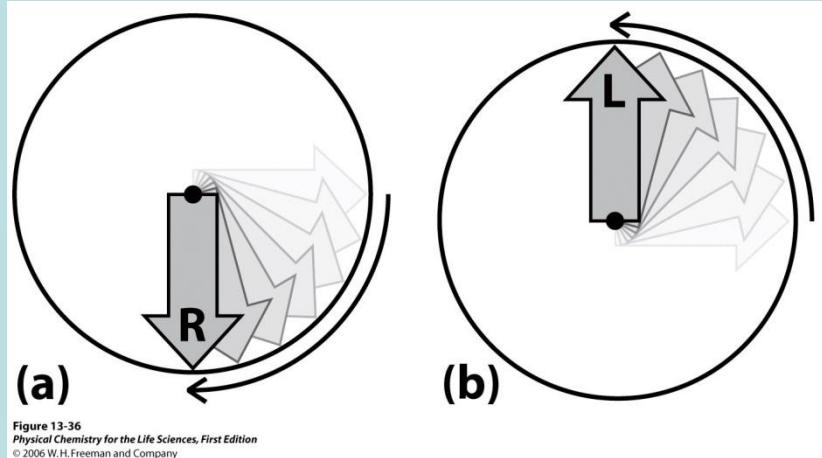


# Moléculas quirais



- Átomos de C assimétricos (com 4 substituintes diferentes)
  - Ex.: alanina  
 $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$
  - Enantiómeros

# Polarização da luz



- As moléculas quirais absorvem a luz com polarizações circulares opostas de modo diferente
- Dicroísmo circular

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \frac{A_L - A_R}{[J]l}$$

# Dicroísmo circular

- Estudar estrutura secundária de proteínas

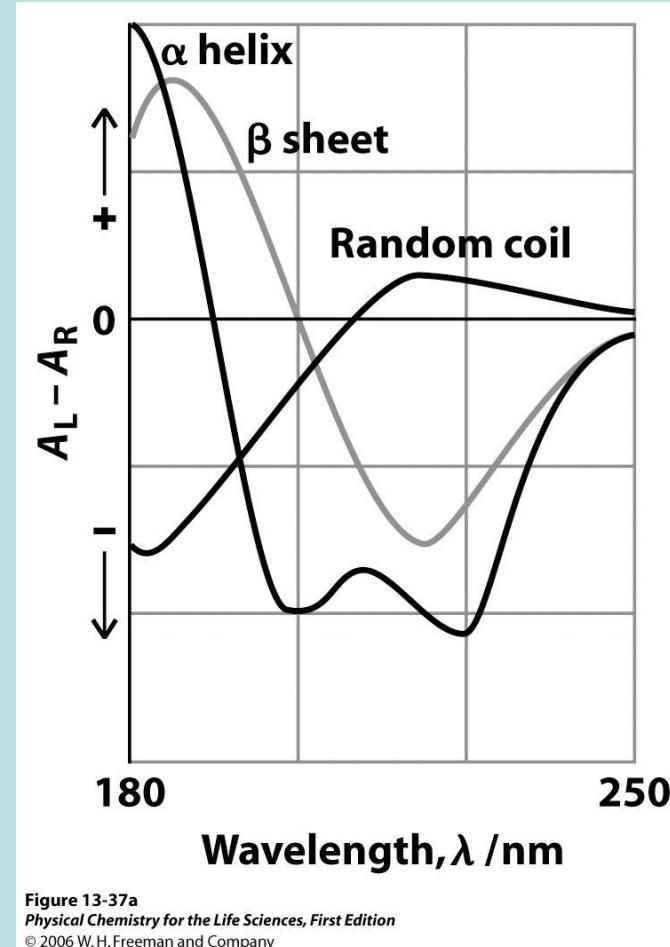


Figure 13-37a  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H.Freeman and Company

# Dicroísmo circular

- Estudar estrutura secundária de ADN

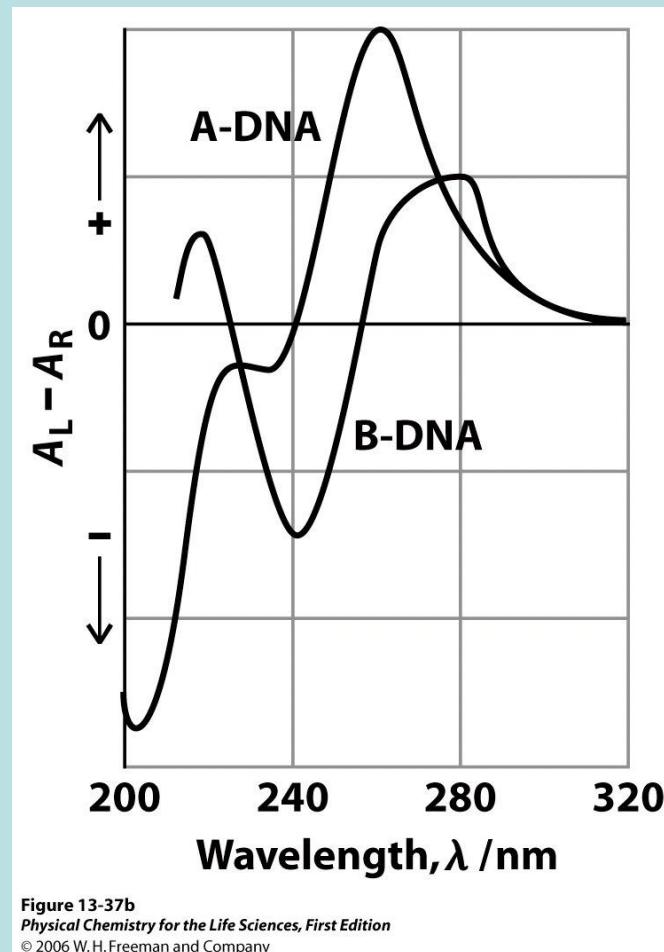


Figure 13-37b  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H.Freeman and Company

# Decaimento por emissão e sem emissão

- Por emissão
  - Fluorescência
  - Fosforescência
- Sem emissão
  - Dissociação

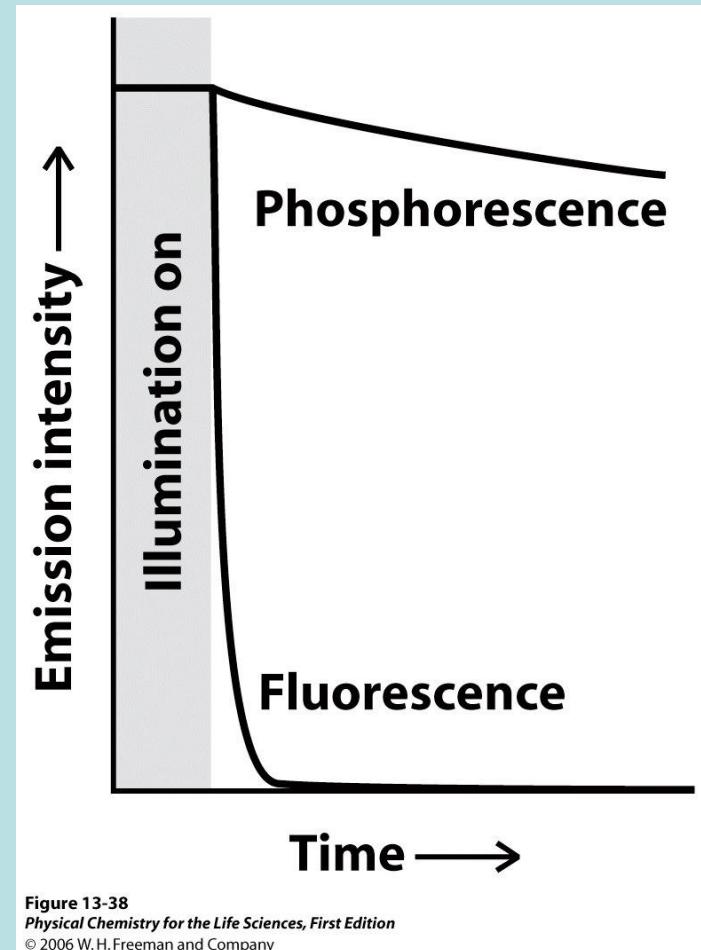
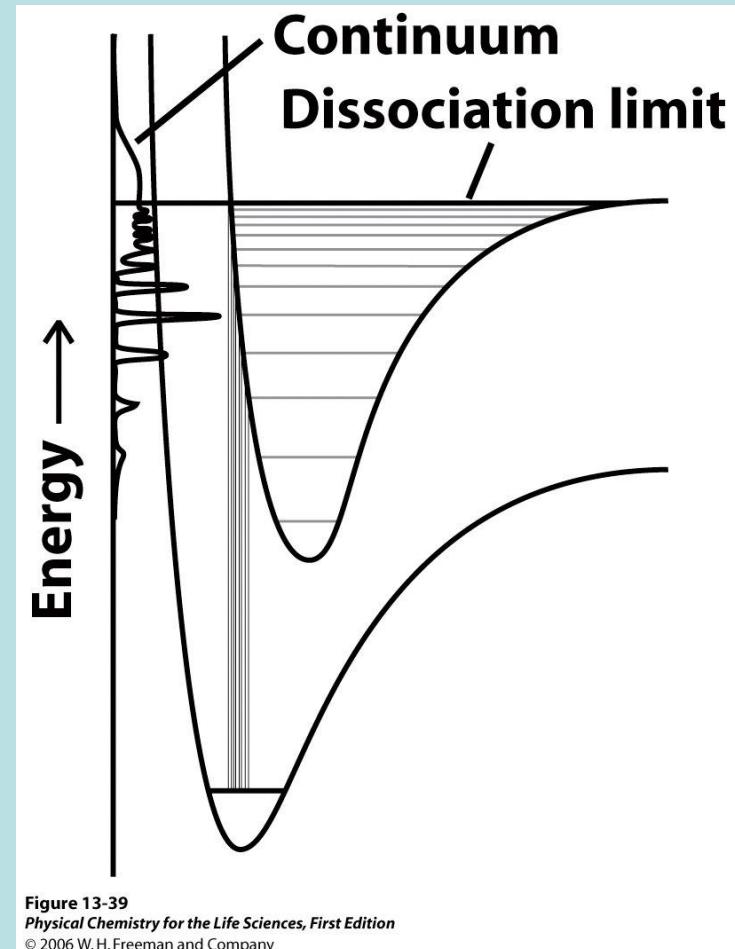


Figure 13-38  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Decaimento por emissão e sem emissão

- Sem emissão
  - Dissociação
  - Transições verticais (princípio de Franck-Condon)



# Processos que causam a fluorescência

Diagrama de Jablonski

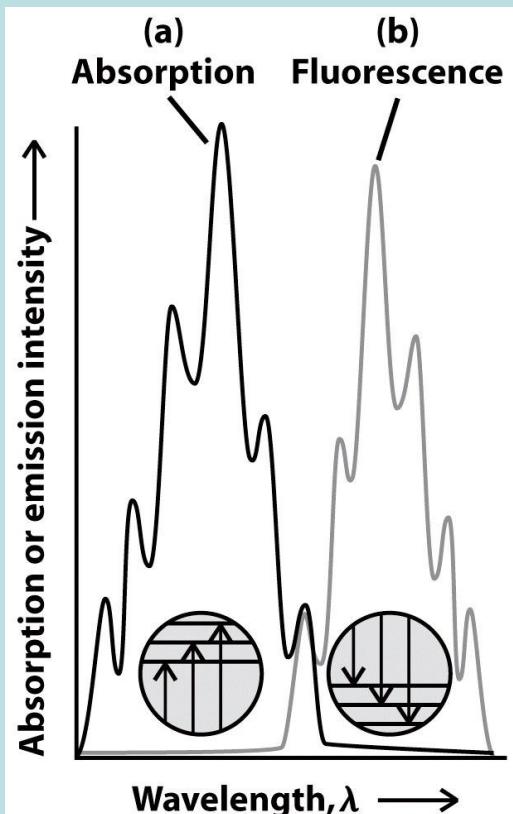


Figure 13-41  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

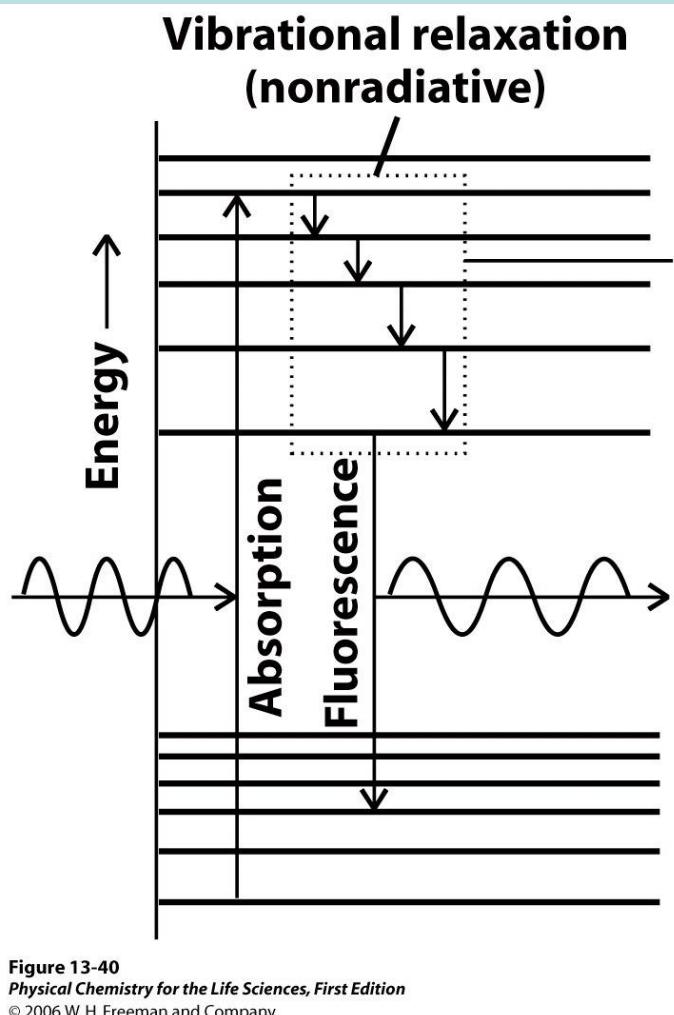


Figure 13-40  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Fluorescência e o relaxamento do solvente

- O c.d.o. da emissão (fluorescência) é maior que o c.d.o. de absorção
  - Relaxamento do solvente
  - Transferência de energia de excitação ao solvente

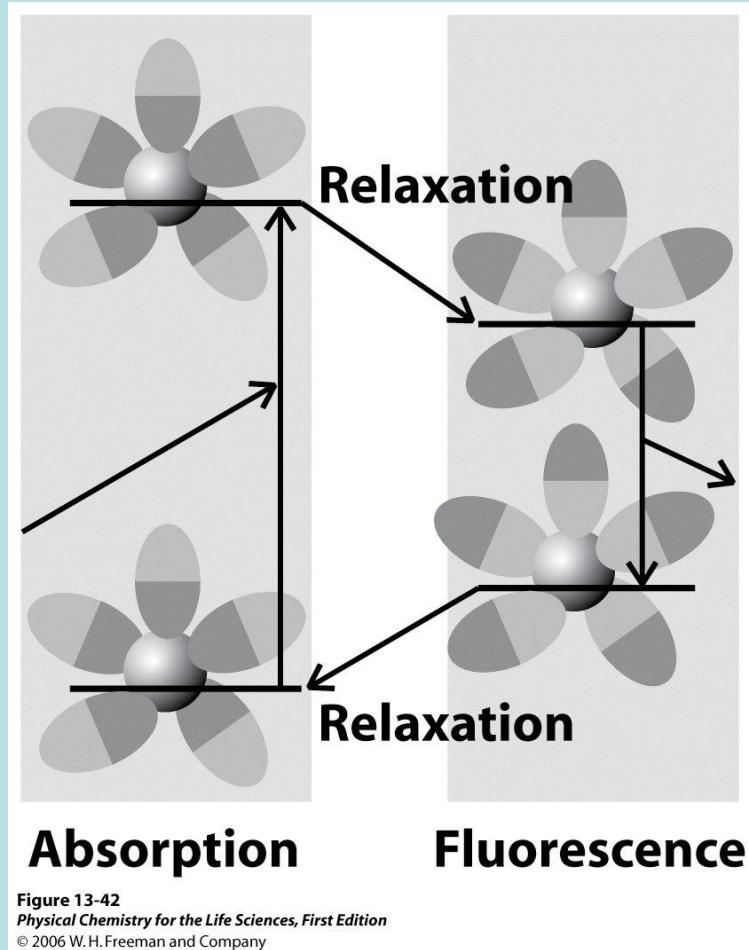


Figure 13-42  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Processos que causam a fosforescência

Diagrama de Jablonski

- Desde um estado excitado tripleto (fluor.: estado excitado singuleto)
- Estado fundamental: singuleto (electrões emparelhados)
- Estado excitado depois de absorver o fotão: singuleto
- Processo de cruzamento intersistemas ( $S \rightarrow T$ )
  - Por acoplamento entre momento angular orbital e o momento angular de spin
  - Facilitado na presença de átomos pesados (S, P), com uma carga nuclear maior
- A transição  $T_1 \rightarrow S_0$  é proibida – emissão muito lenta
- A fosforescência é mais intensa em amostras sólidas, onde a transferência de energia é menos eficaz

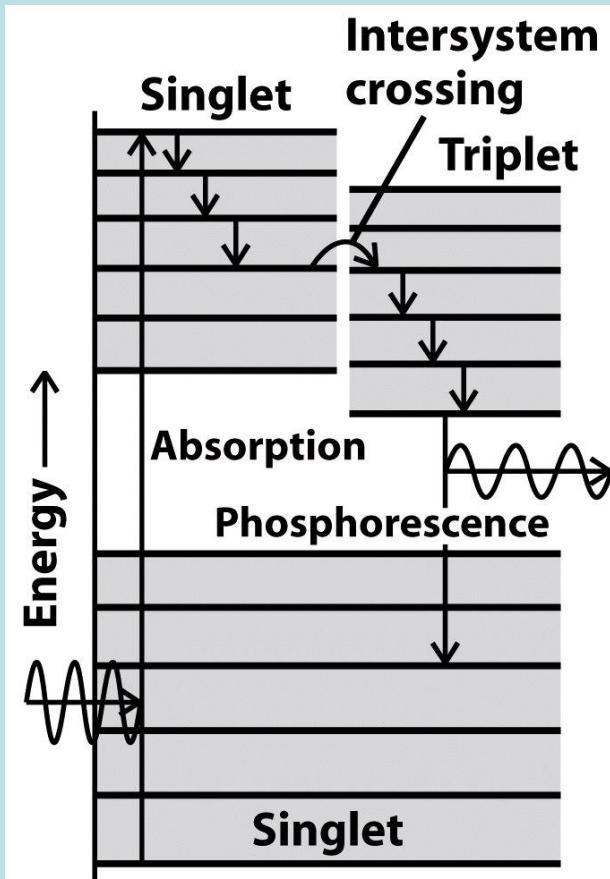
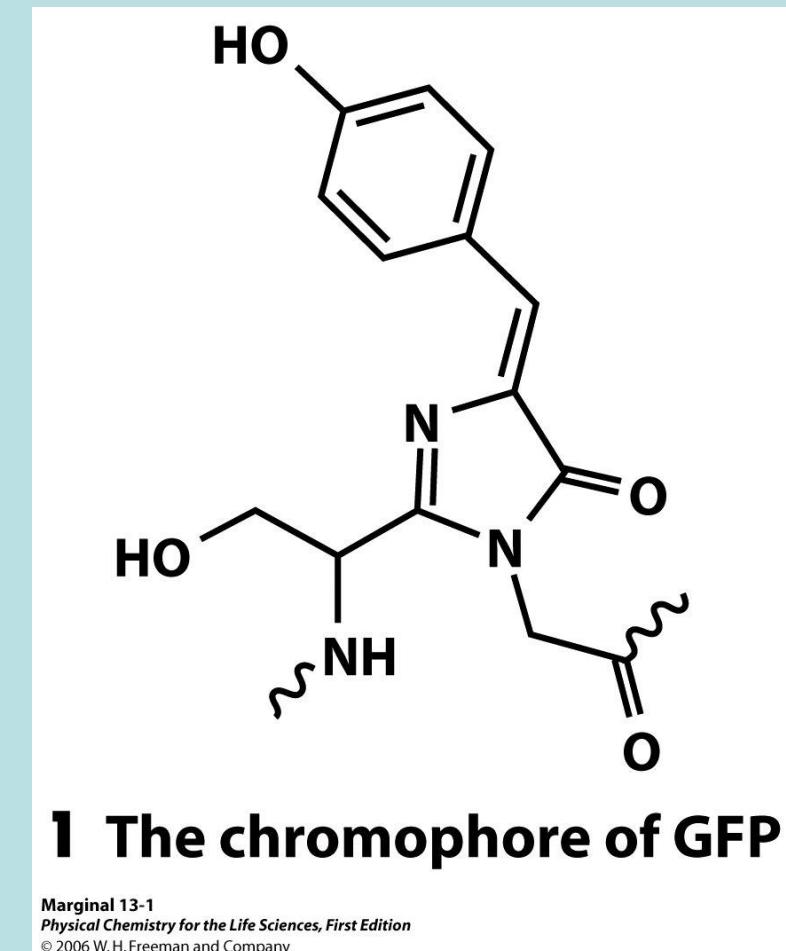


Figure 13-43  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Microscopia fluorescente

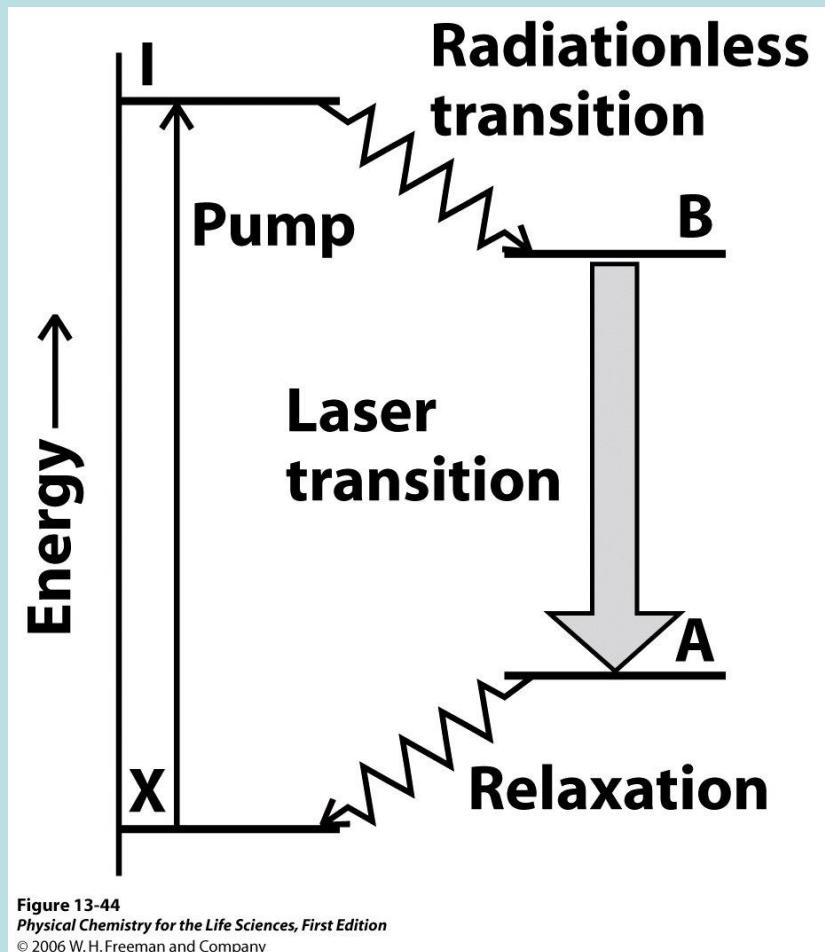
- Clorofitas
- Flavinas
- Aminoácidos
  - Triptofano (280/348)
  - Tirosina (274/303)
  - Fenilalanina (257/282)
  - Ser-Tyr-Gly (oxidado)
  - em GFP (395/509)



Marginal 13-1  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W. H. Freeman and Company

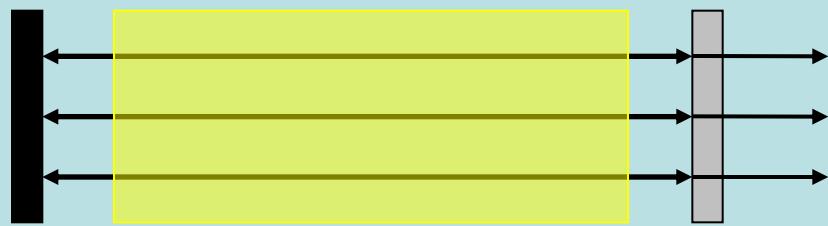
# Lasers

- Emissão estimulada
- Ampliação da radiação
- Inversão de população
  - Laser de 4 níveis →



# Laser

- Cavidade:
  - Meio activo
  - Espelho 100% reflector
  - Espelho semi-transparente
- Partícula (fotão) em caixa
- Condição:
- Modos ressonantes do laser



$$n\lambda/2 = L$$

# Laser

- Mecanismo de acção do laser: emissão estimulada
- O feixe pode ser polarizado
- Com espelhos paralelos – pouca divergência

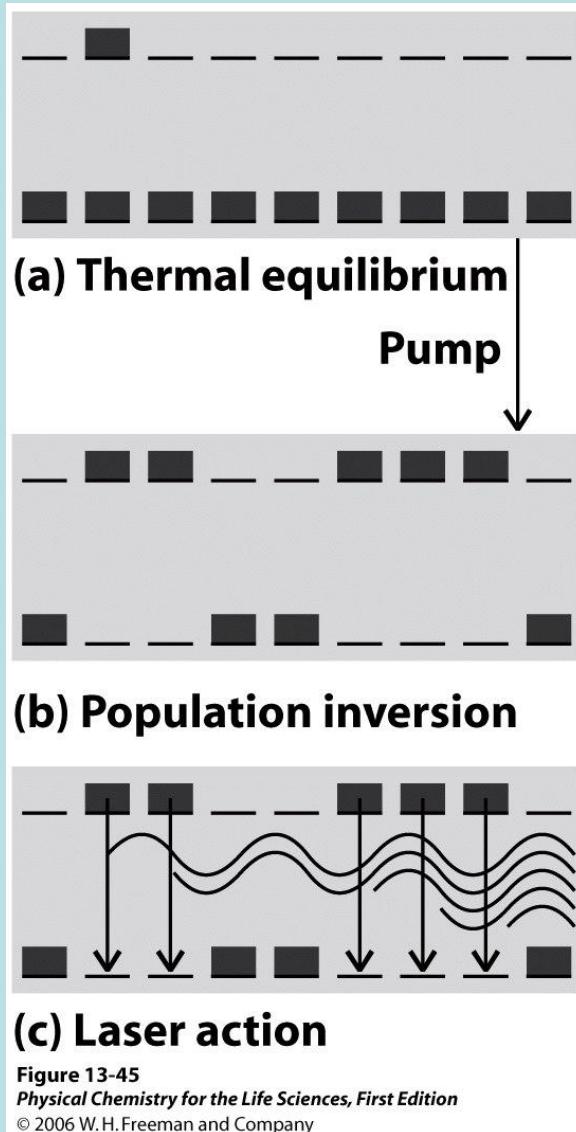
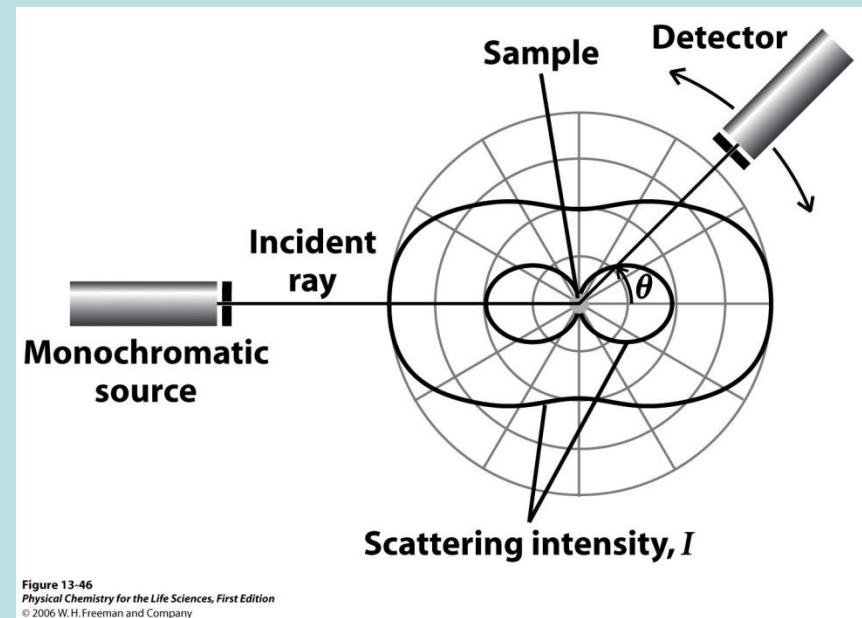


Figure 13-45  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W. H. Freeman and Company

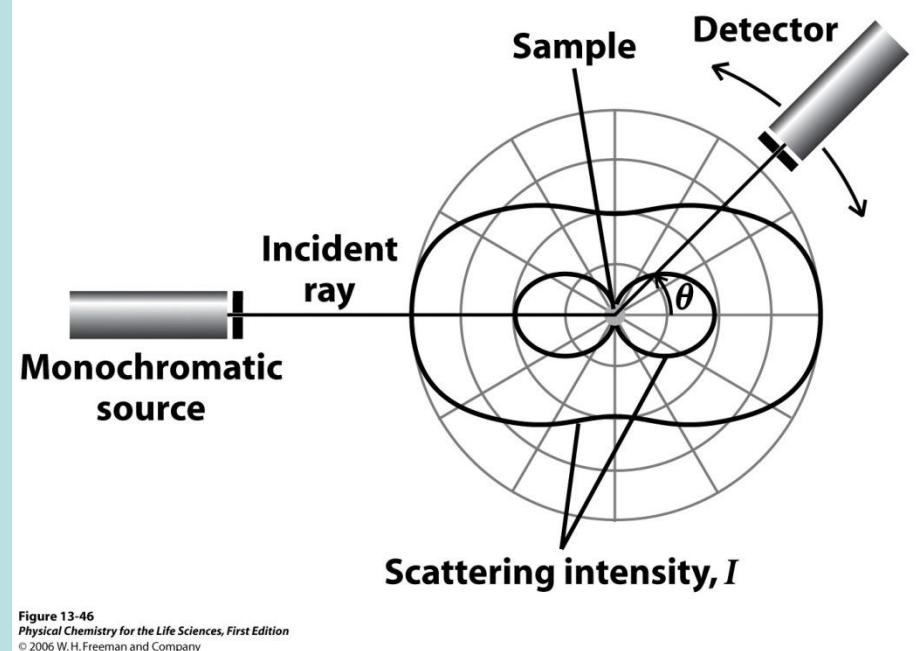
# Aplicação de lasers em bioquímica

- Espalhamento de luz laser
- Espalhamento de Rayleigh: partículas com  $d \ll \lambda$
- $I \propto M \times \lambda^{-4}$



# Espalhamento de luz laser

- $c_M$  – concentração mássica
- $I_0$  – intensidade da luz incidente
- $M$  – massa molar
- $K$  – depende do índice de refracção da solução
- $P_\theta$  – factor estrutural



$$\frac{I_\theta}{I_0} = K P_\theta c_M M$$

# Espalhamento de luz laser

$P_\theta$  – factor estrutural

- $d \ll \lambda : P_\theta \approx 1$
- $d$  ca.  $0,1\lambda$

$R_g$  – raio de giração

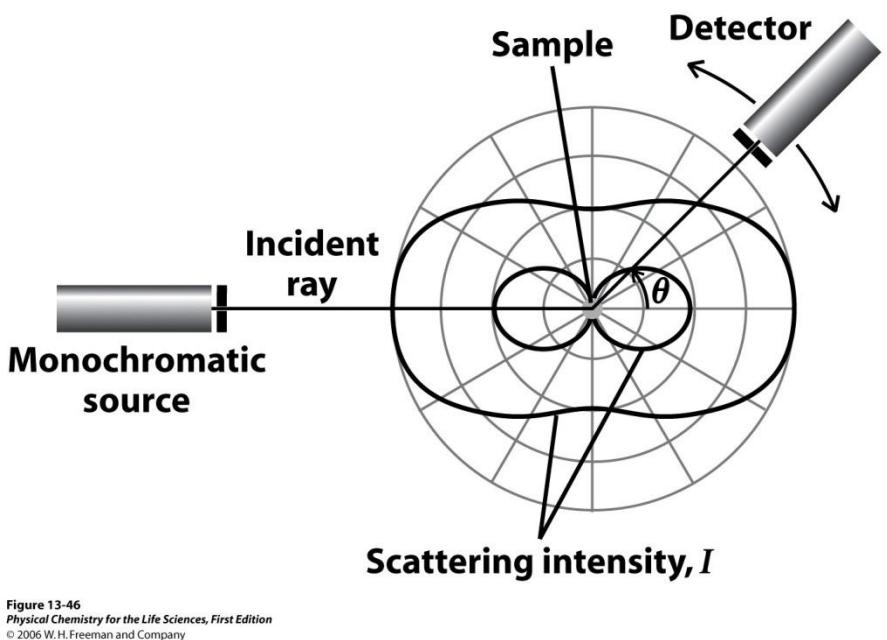


Figure 13-46  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

$$P_\theta \approx 1 - \frac{16\pi^2 R_g^2 \sin^2 \theta / 2}{3\lambda^2}$$

# Valores experimentais

**Table 13.5 Radii of gyration of biological macromolecules and assemblies**

	$M/(\text{kg mol}^{-1})$	$R_g/\text{nm}$
<b>DNA</b>	$4 \times 10^3$	117.0
<b>Myosin</b>	493	46.8
<b>Serum albumin</b>	66	2.98
<b>Tobacco mosaic virus</b>	$3.9 \times 10^4$	92.4

Table 13-5  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Desvios de idealidade da solução

- Macromoléculas reorganizam o solvente e removem-no do espaço que ocupam
- Não têm liberdade de movimento no espaço ocupado por outras MM
- $B$  – efeito do volume excluído

$$\frac{Kc_M}{R_\theta} = \frac{1}{P_\theta M} + Bc_M \quad R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0}$$

# Espalhamento de luz laser

- Tamanho e massa molar podem ser medidos medindo a luz espalhada em função do ângulo
- Exemplo:
  - $c_M = 2,0 \text{ kg m}^{-3}$ ;  $20^\circ\text{C}$ ;  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ;  
 $K = 2,4 \times 10^{-2} \text{ mol m}^3 \text{ kg}^{-2}$
  - Assume-se que  $B = 0$  e a molécula é pequena

$\theta$	15,0	45,0	70,0	85,0	90,0
$R_\theta$	23,8	22,9	21,6	20,7	20,4

# Espalhamento de luz laser

$$\frac{1}{R_\theta} = \frac{1}{Kc_M M} + \left( \frac{16\pi^2 R_g^2}{3\lambda^2} \right) \left( \frac{1}{R_\theta} \sin^2 \theta/2 \right)$$

gráfico :  $1/R_\theta$  vs  $\frac{1}{R_\theta} \sin^2 \theta/2$

uma recta :  $m = \frac{16\pi^2 R_g^2}{3\lambda^2}$   $b = \frac{1}{Kc_M M}$

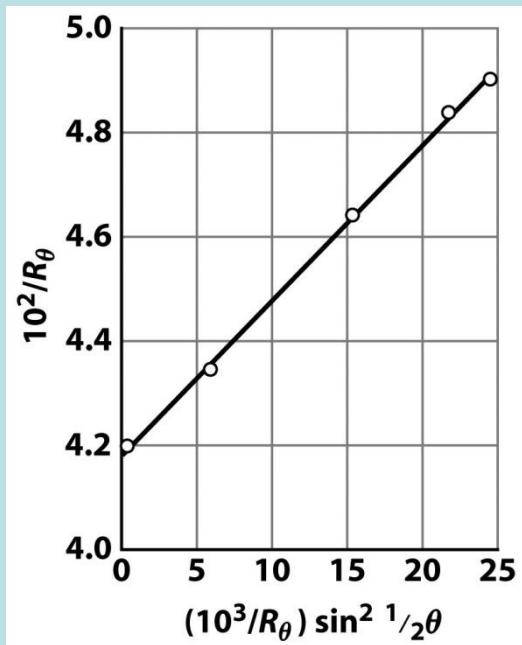


Figure 13-47  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

$10^2/R_\theta$	4,20	4,37	4,63	4,83	4,90
$(10^3/R_\theta) \sin^2(\theta/2)$	0,716	6,40	15,2	22,0	24,5

# Espalhamento de luz laser

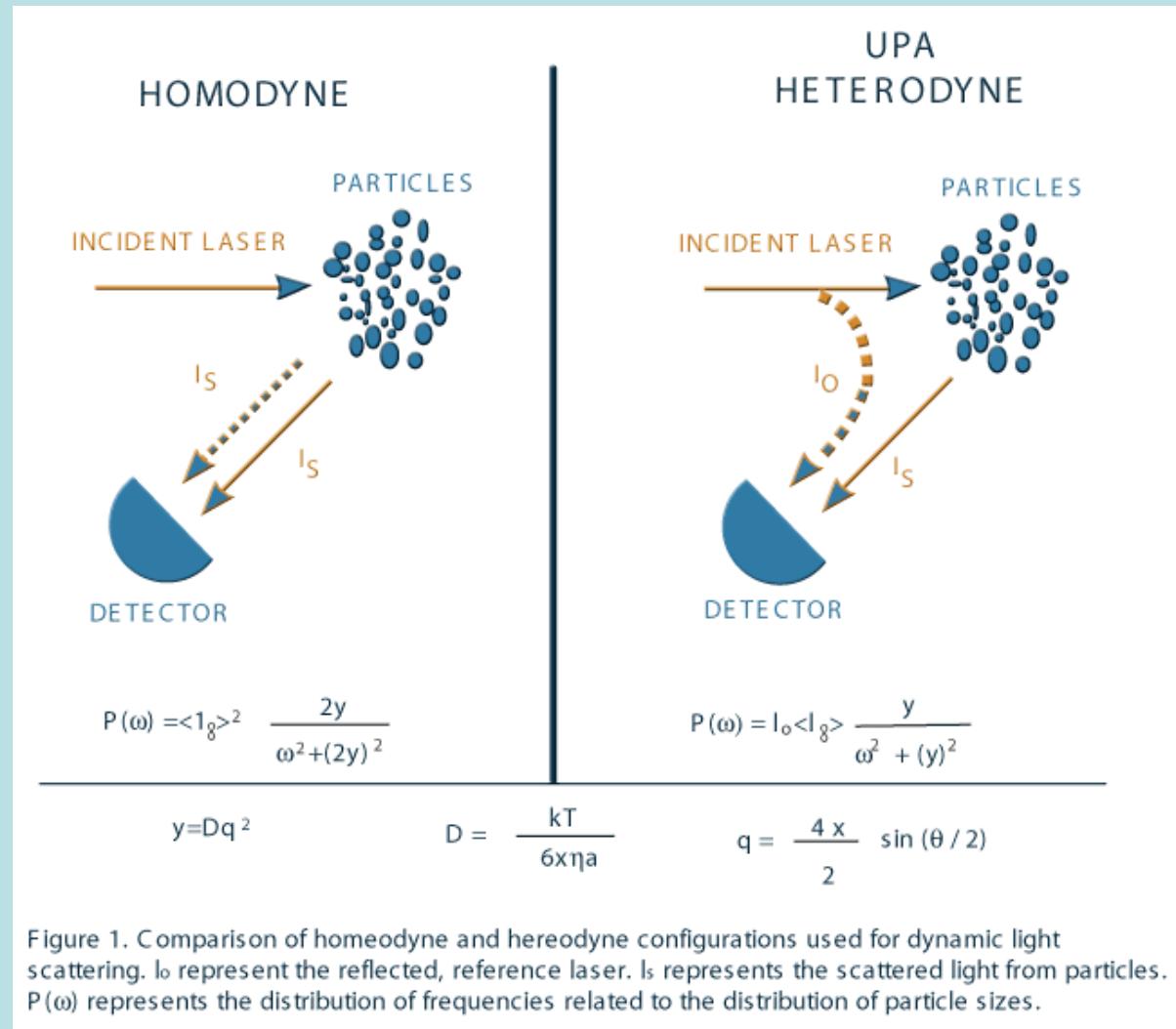
- $m = 0,295$ ;  $b = 4,18 \times 10^{-2}$

$$R_g = \left( \frac{3\lambda^2 m}{16\pi^2} \right)^{\frac{1}{2}} = \left( \frac{3 \times (532 \text{ nm})^2 \times 0,295}{16\pi^2} \right)^{\frac{1}{2}} = 39,8 \text{ nm}$$

$$M = \frac{1}{Kc_M b} = \frac{1}{(2,40 \times 10^{-2} \text{ mol m}^{-3} \text{ kg}^{-2}) \times (2,00 \text{ kg m}^{-3}) \times (4,18 \times 10^{-2})} \\ = 4,98 \times 10^2 \text{ kg mol}^{-1}$$

# Espalhamento dinâmico da luz

- Estudos de difusão
- Interferência da luz espalhada por várias moléculas provoca variações da intensidade
- depende do  $D$   
→ tamanho



# Espalhamento dinâmico da luz

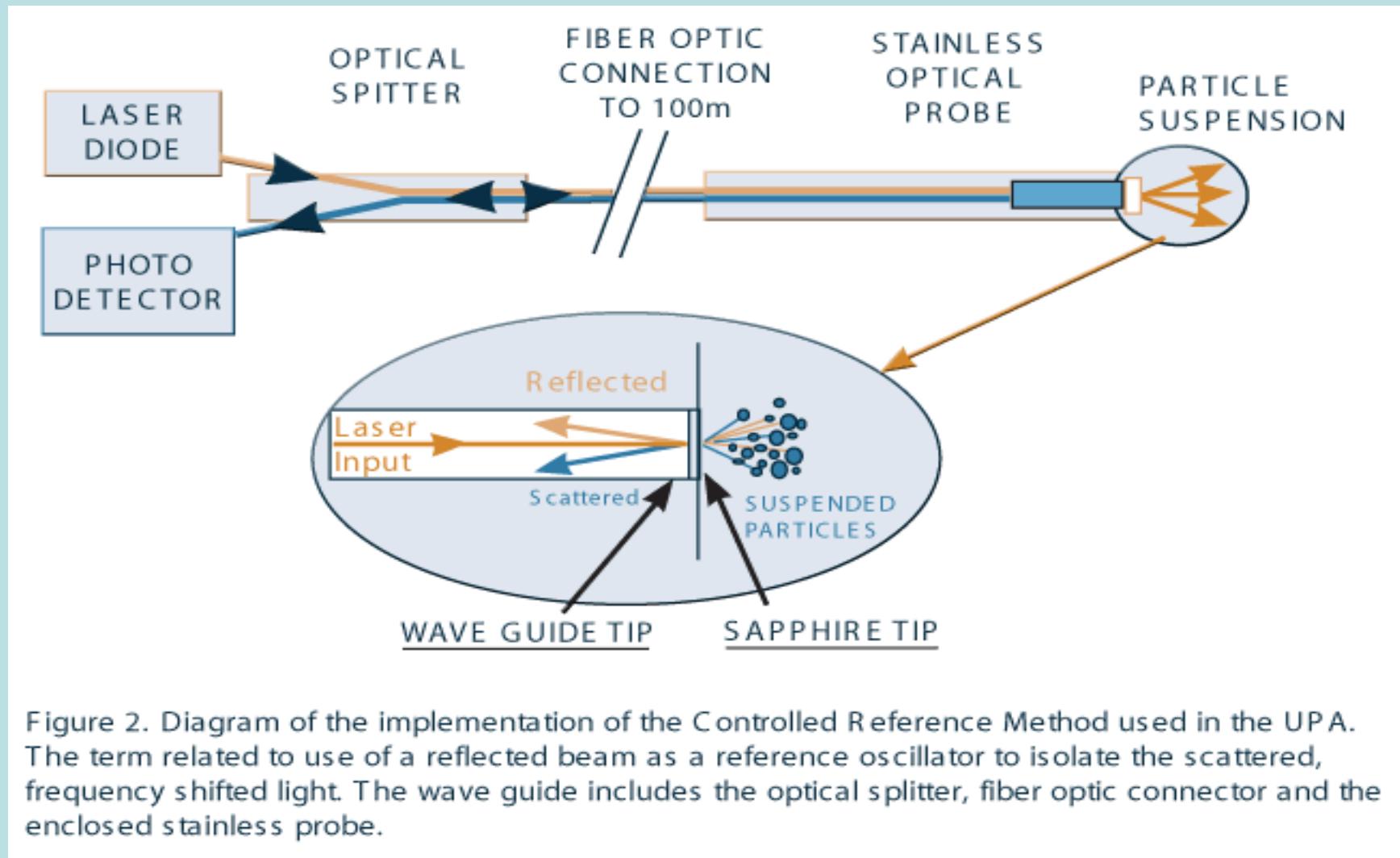


Figure 2. Diagram of the implementation of the Controlled Reference Method used in the UPA. The term related to use of a reflected beam as a reference oscillator to isolate the scattered, frequency shifted light. The wave guide includes the optical splitter, fiber optic connector and the enclosed stainless probe.

# Espectroscopia com resolução temporal

- Ca. 10 ns: reacções controladas por difusão
- 1 fs – 1 ps: transferência de energia, vibrações moleculares
- Atraso  $\Delta d = 3 \text{ mm} \rightarrow \Delta t = 10 \text{ ps}$
- Absorção, fluorescência, esp. Raman de ressonância

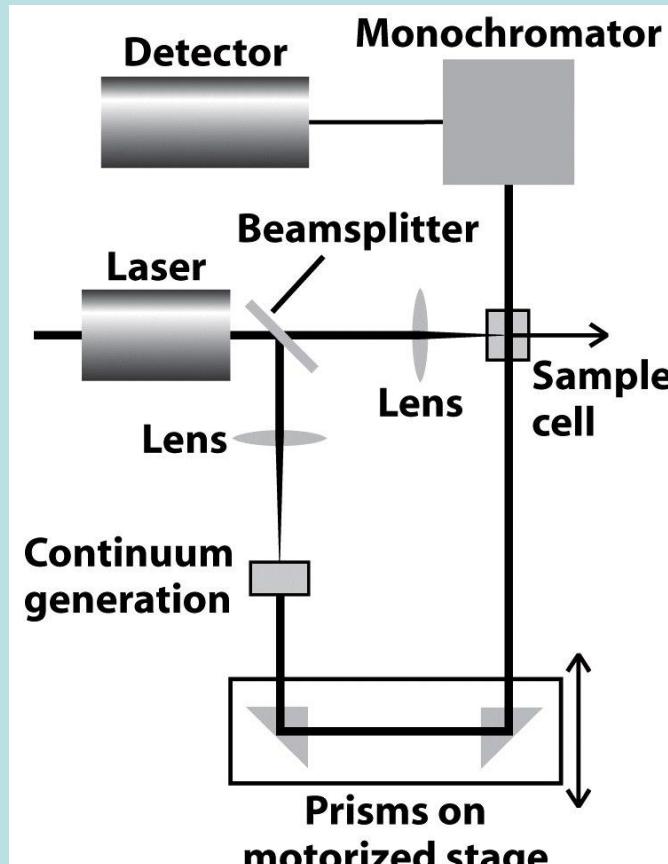
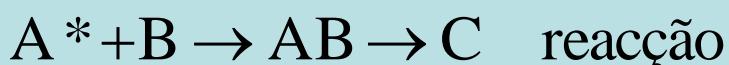


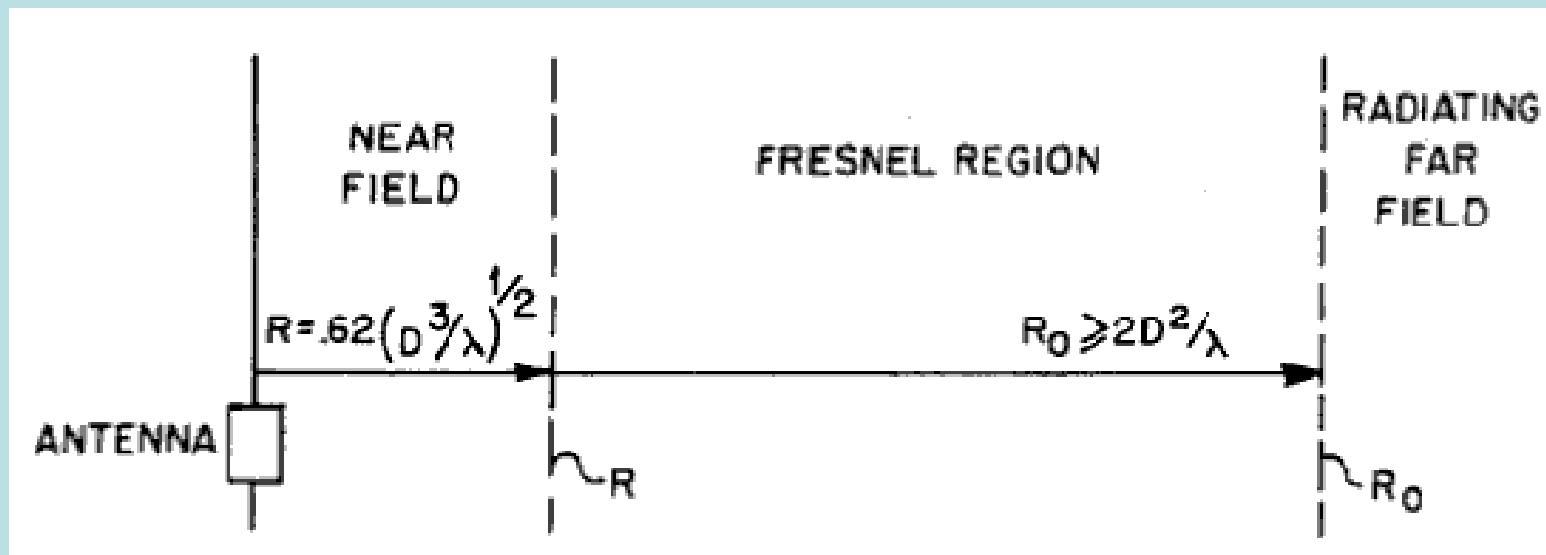
Figure 13-48  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
 © 2006 W.H. Freeman and Company

# Espectroscopia de moléculas individuais

- Estratégias para ultrapassar o limite imposto pela difracção
  - Usar concentrações reduzidas
  - Near - field optical microscopy (NSOM) – microscopia de campo próximo (resolução 50 – 100 nm)
  - Microscopia confocal de campo remoto: a luz é focada
- Emissão de proteínas marcados por um indicador fluorescente

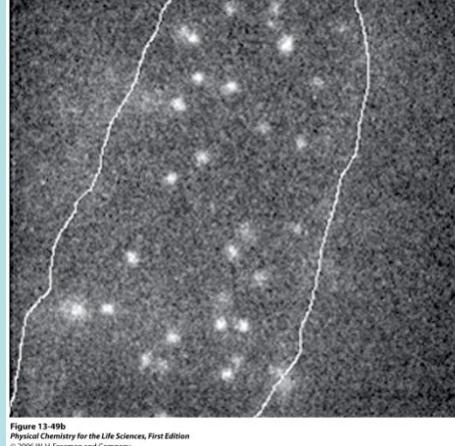
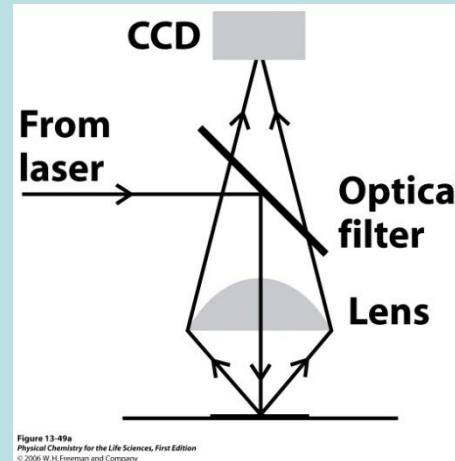
# Espectroscopia de moléculas individuais

- Campo próximo:
  - $\lambda = 550 \text{ nm}$ ;  $D = 100 \text{ nm}$ ;  
→ zona de campo próximo  $R \approx 25 \text{ nm}$

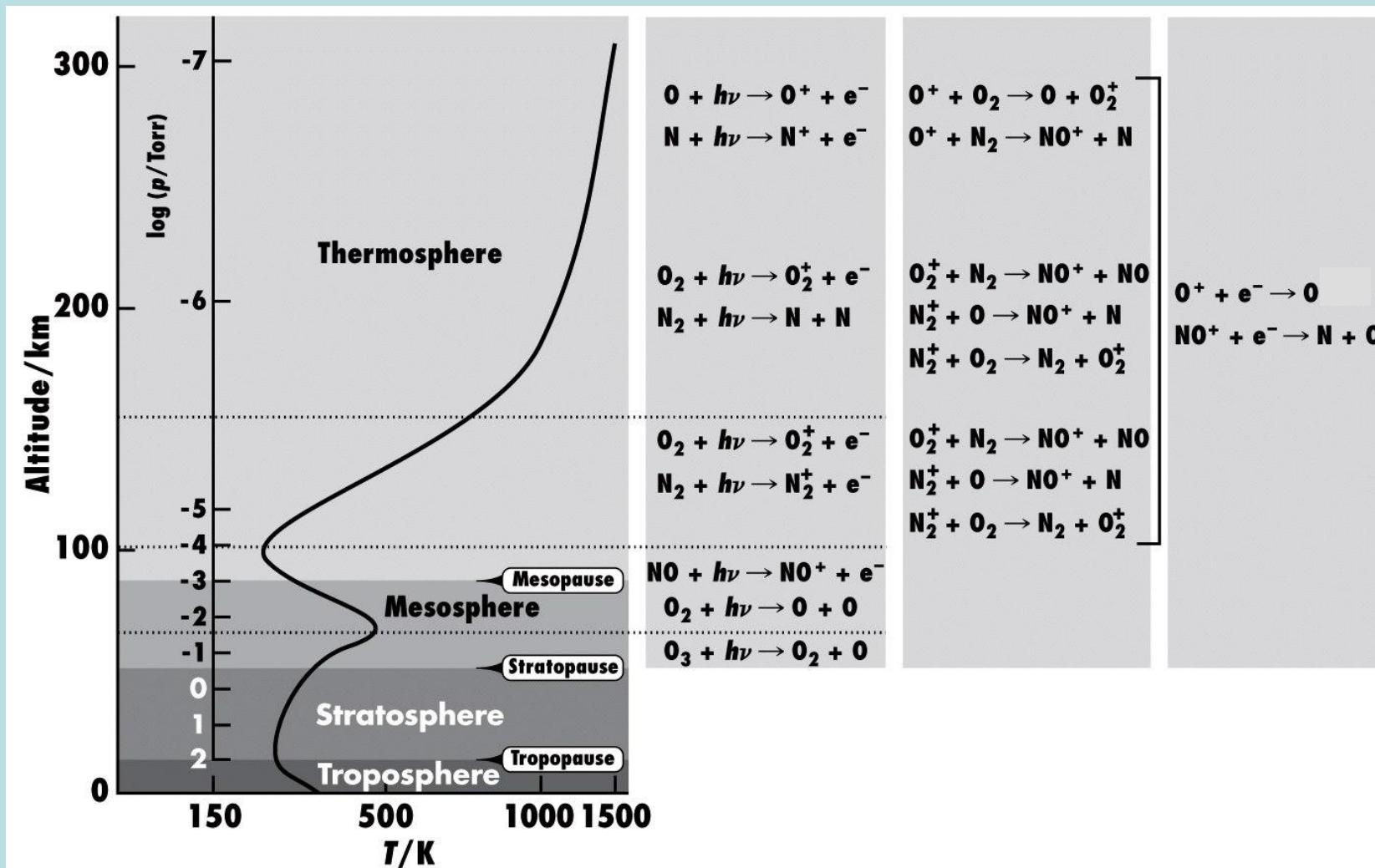


# Espectroscopia de moléculas individuais

- Epifluorescência de campo largo
  - “epi” – “próximo a”
- A luz de excitação passa pela mesma lente da observação



# Reacções fotoquímicas na atmosfera



# Fotobiologia

- Reacções bioquímicas iniciadas por absorção da luz
- Fotossíntese
- Visão
- Danos a ADN
- Terapias

# Cinética de decaimento dos estados excitados

$$\phi = \frac{\text{Número de eventos}}{\text{Número de fotões absorvidos}} \quad - \text{rendimento quântico primário}$$

$$\phi = \frac{\text{Velocidade}}{I_{\text{abs}}}$$

$$\sum_i \phi_i = \sum_i \frac{Vel_i}{I_{\text{abs}}} = 1$$

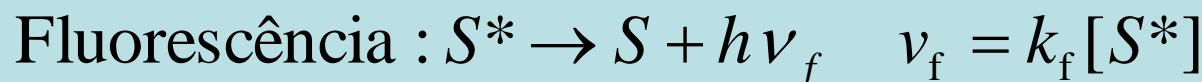
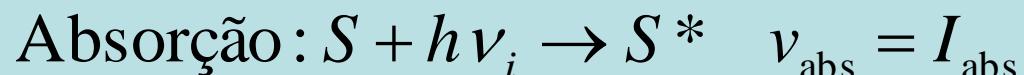
$\Phi$  – rendimento quântico total

- $\text{HI} + h\nu \rightarrow \text{H} + \text{I}$
- $\text{H} + \text{HI} \rightarrow \text{H}_2 + \text{I}$
- $\text{I} + \text{I} + \text{M} \rightarrow \text{I}_2 + \text{M}$

$$\Phi = 2$$

# Cinética de decaimento dos estados excitados

- Absorção:  $10^{-16} - 10^{-15}$  s
- Fluorescência:  $10^{-12} - 10^{-6}$  s
- Reacções a partir do estado excitado singuleto:  
– Visão  
– Fotossíntese
- Fosforescência:  $10^{-6} - 10^{-1}$  s
- Reacções a partir do estado excitado triplexo



# Cinética de decaimento dos estados excitados

- Taxa (?) e rendimento quântico de fluorescência

Velocidade de formação da  $S^* := I_{\text{abs}}$

Velocidade de decaimento da  $S^* := -k_f [S^*] - k_{\text{ISC}} [S^*] - k_{\text{IC}} [S^*]$   
 $= -(k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}}) [S^*]$

$$[S^*]_t = [S^*]_0 \exp(-t / \tau_0)$$

Tempo de vida aparente da fluorescência :  $\tau_0 = \frac{1}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}}}$

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}}}$$

# Dedução

$[S^*]$  Pequeno - aprox. do estado estacionário

$$\frac{d[S^*]}{dt} = I_{\text{abs}} - (k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}})[S^*] = 0$$

$$I_{\text{abs}} = (k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}})[S^*]$$

$$\phi_f = \frac{\text{Taxa de fluorescência}}{I_{\text{abs}}} = \frac{k_f [S^*]}{(k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}})[S^*]}$$

$$\phi_f = \frac{k_f}{(k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}})}$$

# Exemplo

- O tempo de vida aparente de fluorescência pode ser medido
- Exemplo: triptófano em H<sub>2</sub>O;  $\phi_f = 0,20$ ;  
 $\tau_0 = 2,6$  ns;  
Então  $k_f = 7,7 \times 10^7$  s<sup>-1</sup>

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f + k_{ISC} + k_{IC}} = \left( \frac{k_f}{k_f + k_{ISC} + k_{IC}} \right) \frac{1}{k_f} = \frac{\phi_f}{k_f}$$

# Supressão (quenching) de fluorescência

- Remoção de energia sem emissão
- Equação de Stern-Volmer

$$\frac{\phi_{f,0}}{\phi_f} = 1 + \tau_0 k_Q [Q]$$

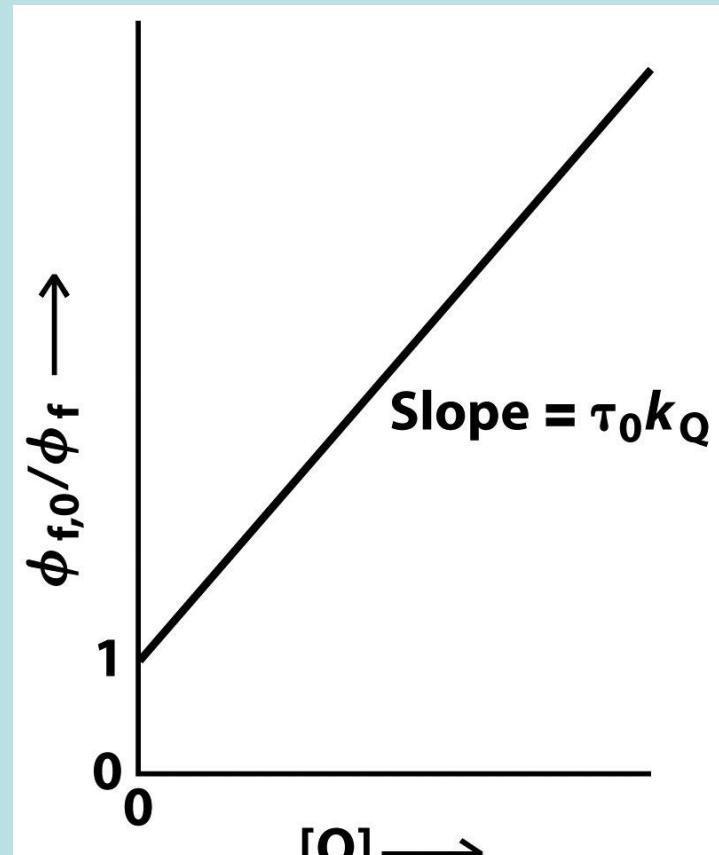


Figure 13-51  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Derivação

- Equação de Stern-Volmer

Supressão  $S^* + Q \rightarrow S + Q$  taxa de supressão  $k_Q[Q][S^*]$

$$\frac{d[S^*]}{dt} = I_{\text{abs}} - (k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}} + k_Q[Q])[S^*] = 0$$

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}} + k_Q[Q]}$$

na presença de suppressor  $\tau = \frac{1}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}} + k_Q[Q]}$

quando  $[Q] = 0 \Rightarrow \phi_{f,0} = \frac{k_f}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}}}$

$$\Rightarrow \frac{\phi_{f,0}}{\phi_f} = \left( \frac{k_f}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}}} \right) \times \left( \frac{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}} + k_Q[Q]}{k_f} \right)$$

$$= \frac{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}} + k_Q[Q]}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}}} = 1 + \frac{k_Q}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{IC}}}[Q]$$

# Supressão (quenching) de fluorescência

- Intensidade e tempo de vida são proporcionais ao rendimento quântico  
→ obedecem a mesma equação

$$\frac{I_{f,0}}{I_f} = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{\phi_{f,0}}{\phi_f} = 1 + \tau_0 k_Q [Q]$$

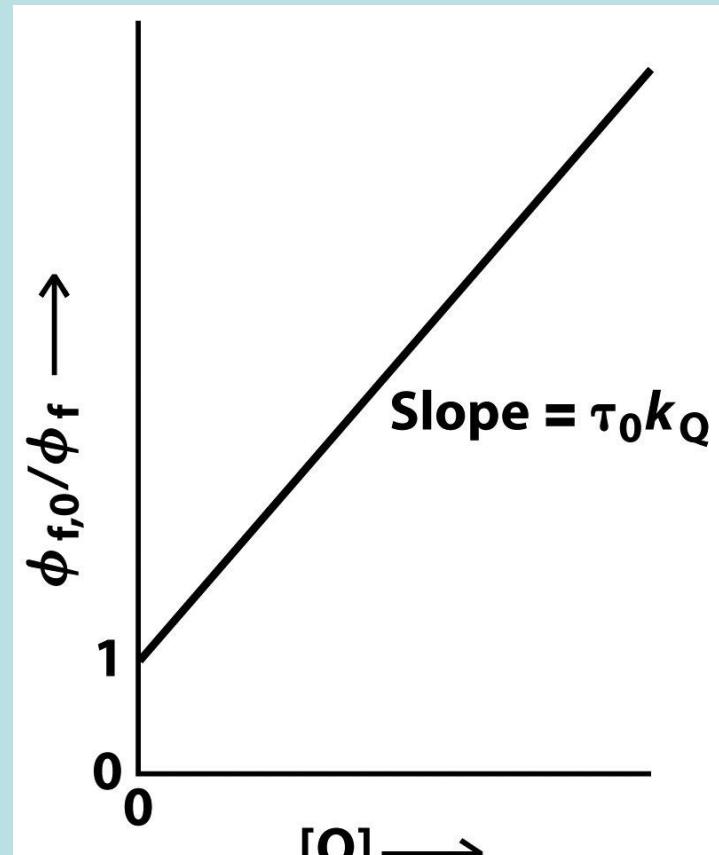


Figure 13-51  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Exemplo: constante de supressão

- Triptófano;  $O_2$  dissolvido

$[O_2]/(10^{-2} \text{ mol L}^{-1})$	0	2,3	5,5	8,0	10,8
$\tau/(10^{-9} \text{ s})$	2,6	1,5	0,92	0,71	0,57

# Exemplo: constante de supressão

- Tryptófano;  
 $O_2$  dissolvido

$$k_Q = 1,3 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_Q [Q]$$

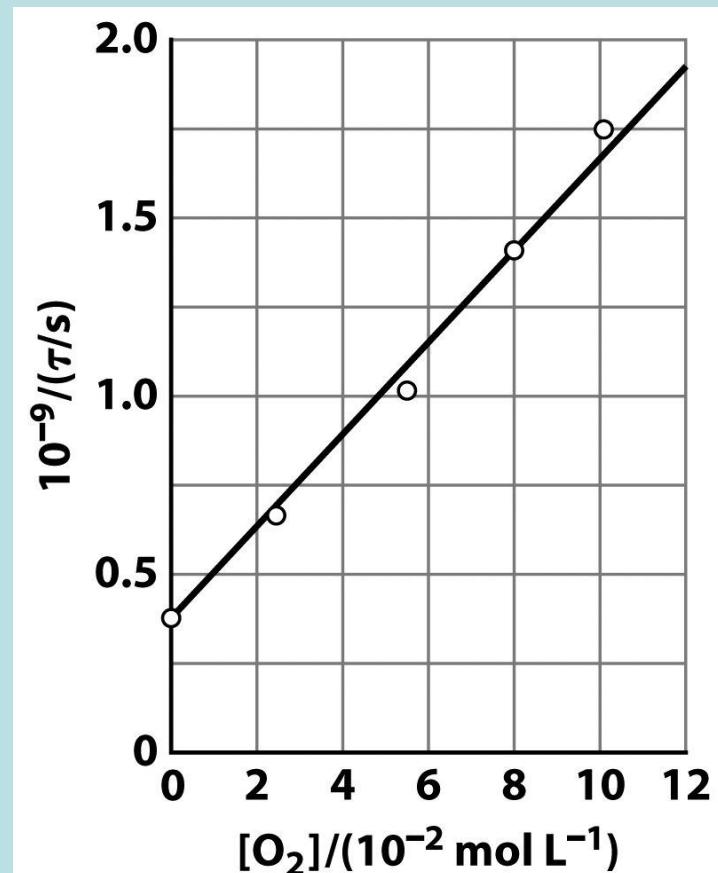


Figure 13-52  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Mecanismos de supressão de estados excitados

De-excitação por colisões :  $S^* + Q \rightarrow S + Q$

Transferência electrónica :  $S^* + Q \rightarrow S^+ + Q^-$  ou  $S^- + Q^+$

Transferência ressonante de energia :  $S^* + Q \rightarrow S + Q^*$

- Por colisões: eficaz com  $Q$  – uma espécie pesada, como átomo  $I$ 
  - Ex.: triptófano pode ser suprimido quando está na superfície do proteína

# Transferência electrónica

- Taxa de t.e.: Teoria de Marcus
  1. Diminui com a distância entre  $S^*$  e Q
  2.  $\Delta_r G < 0$  : o potencial de redução de  $S^*$  deve ser mais baixo que o do Q
  3. A energia de reorganização do reorganização do  $S^*$ , Q e solvente deve ser próxima ao  $\Delta_r G$
- Pode ser estudado usando a espectroscopia com resolução temporal

# Transferência ressonante de energia

- $S^* + Q \rightarrow S + Q^*$
- Teoria de Förster
  - $S^*$  e Q devem estar próximos (ca. nm)
  - Fotões emitidos por  $S^*$  podem ser absorvidos por Q

$$\varepsilon_T = 1 - \frac{\phi_f}{\phi_{f,0}}$$

sistema rígido :  $\varepsilon_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$

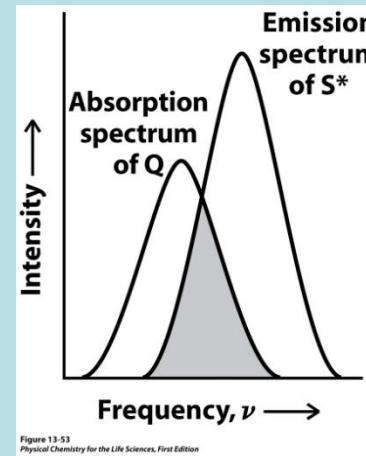


Figure 13-53  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Valores de $R_0$

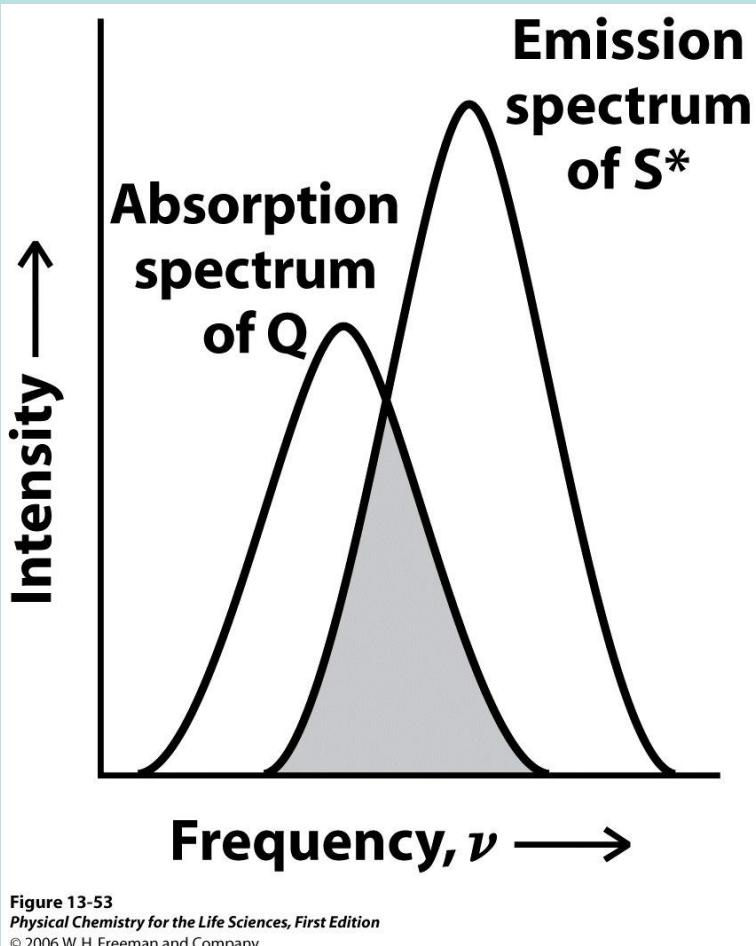


Figure 13-53  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
 © 2006 W.H. Freeman and Company

**Table 13.6** Values of  $R_0$  for some donor-acceptor pairs\*

Donor	Acceptor	$R_0/\text{nm}$
Naphthalene	Dansyl	2.2
Dansyl	ODR	4.3
Pyrene	Coumarin	3.9
IAEDANS	FITC	4.9
Tryptophan	IAEDANS	2.2
Tryptophan	Heme	2.9

\*Abbreviations:

Dansyl, 5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonic acid

FITC, fluorescein-5-isothiocyanate

IEADANS, 5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid

ODR, octadecyl-rhodamine

Table 13-6  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
 © 2006 W.H. Freeman and Company

# Transferência ressonante de energia

- Medição de distâncias em sistemas biológicos
- Calcula-se a distância (entre 1 nm e 9 nm) sabendo o  $R_0$

$$\varepsilon_T = 1 - \frac{\phi_f}{\phi_{f,0}}$$

sistema rígido :  $\varepsilon_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$

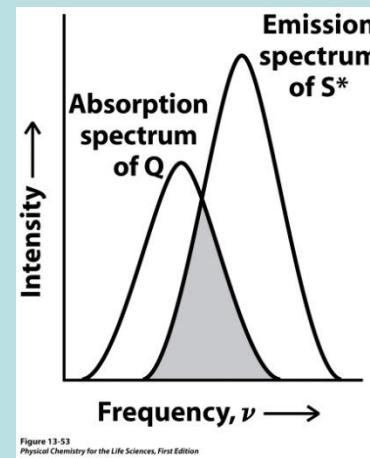
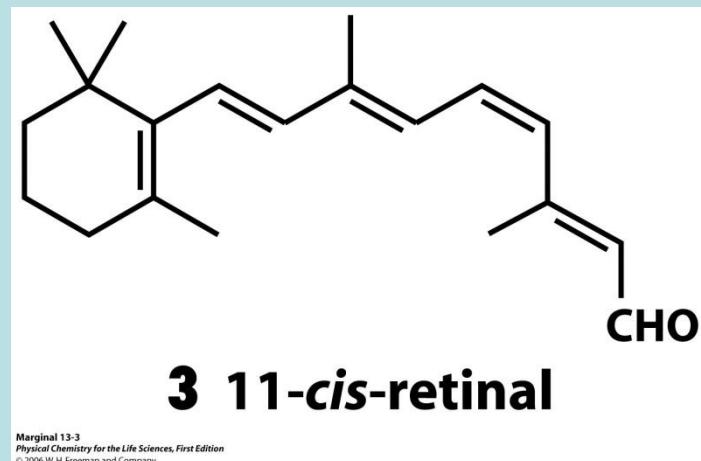
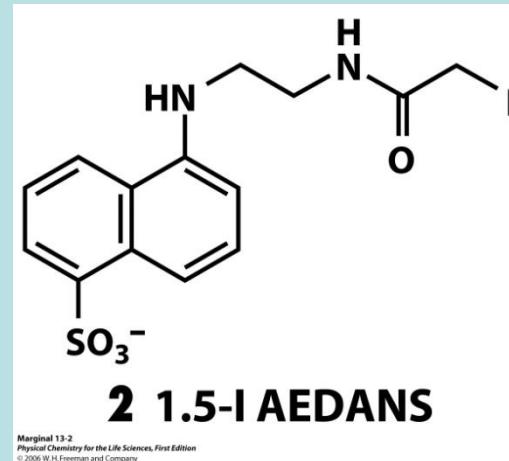


Figure 13-53  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company

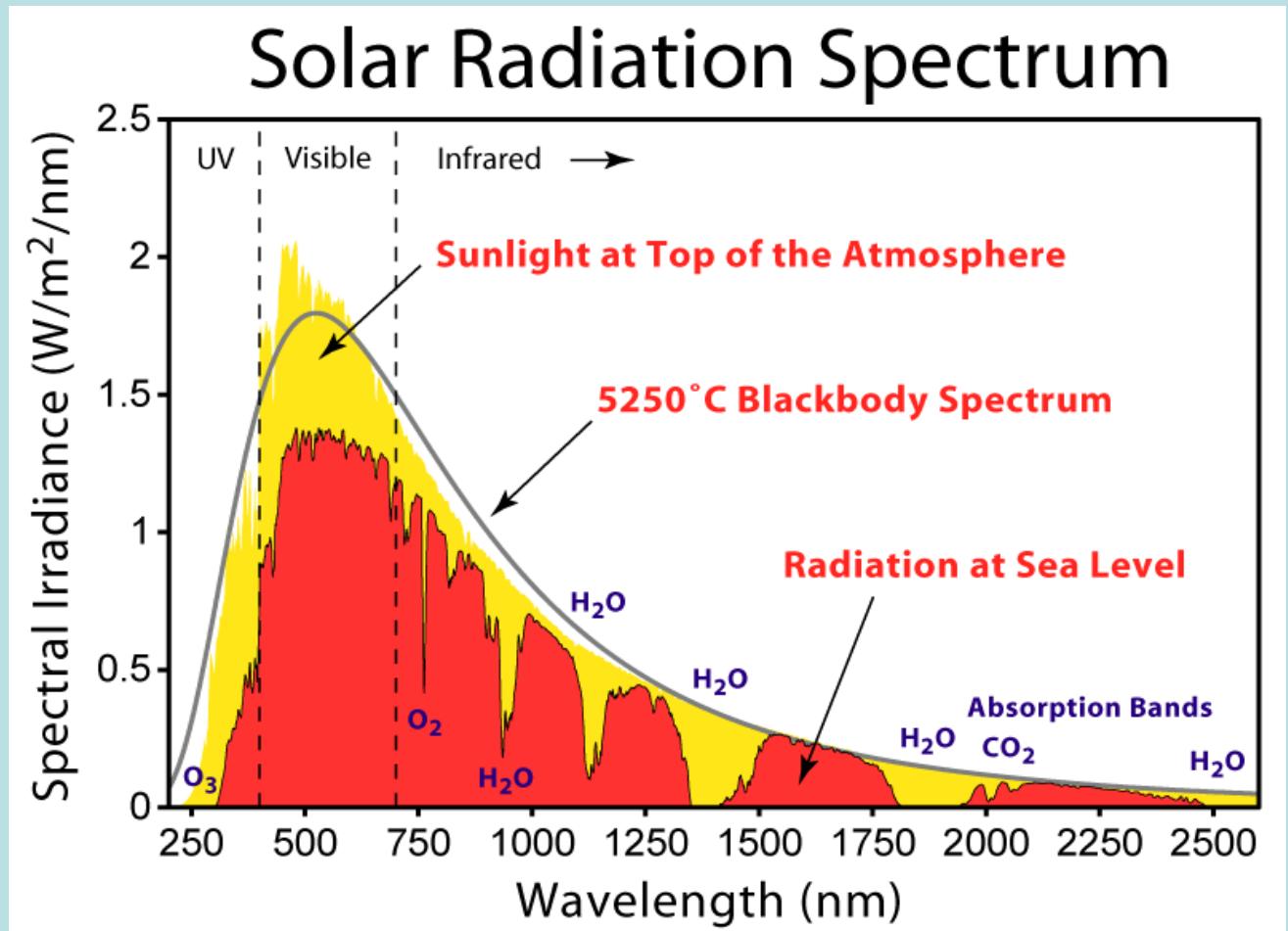
# Exemplo: usar a técnica FRET

- Um aminoácido na superfície de rodopsina for marcado com 1.5-I AEDANS
- Rendimento quântico foi reduzido de 0,75 para 0,68 (supressão por retinal)
- $\varepsilon_T = 0,093$  ( $R_0=5,4$  nm)  
→  $R=7,9$  nm

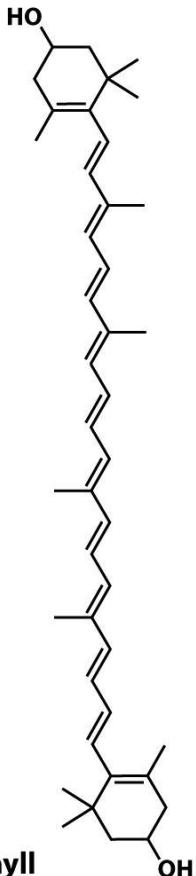


# Luz em biologia e medicina

- Luz solar: até  $1 \text{ kW m}^{-2}$



# Visão



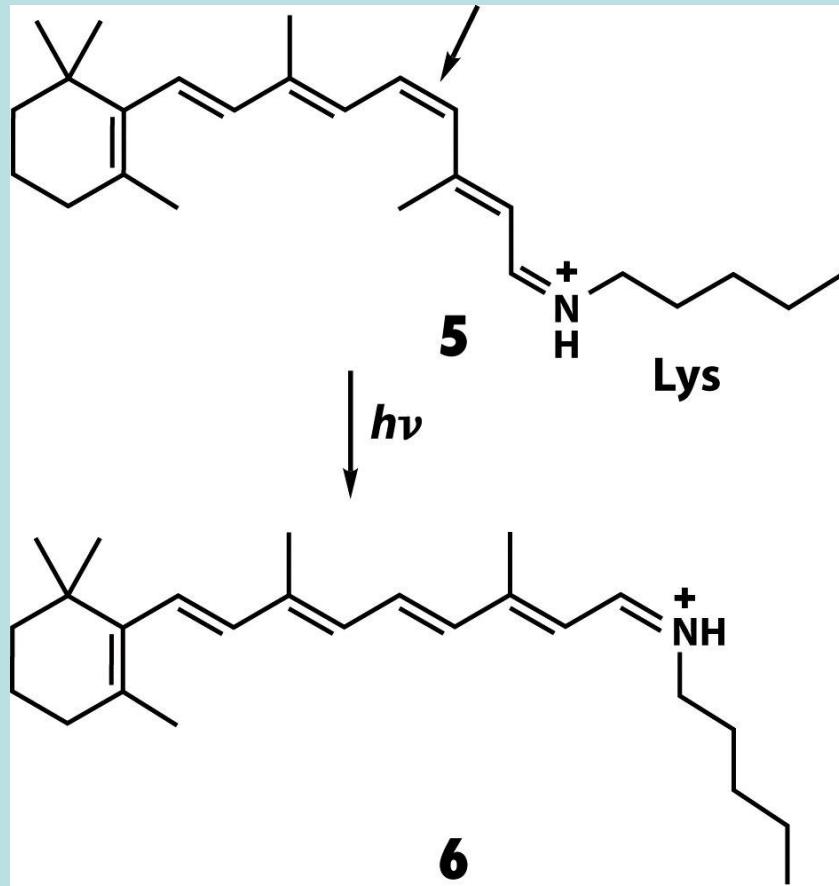
**4** A xanthophyll

Marginal 13-4  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W. H. Freeman and Company

Xantofila:  
transição  $\pi-\pi^*$ ;  
corrige aberração  
cromática

11-cis-retinal, ligado a  
rodopsina: pigmento  
visual

Fotoisomerização:  
transição  $\pi-\pi^*$ ; 200  
ps;  $\phi=2/3$ ;  
em 0,25-0,50 ms  
rodopsina fica  
activado



Marginals 13-5 and 6  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W. H. Freeman and Company

# Visão

- Xantofila:  
transição  $\pi-\pi^*$ ; corrige  
aberração cromática
- 11-cis-retinal, ligado ao  
rodopsina: pigmento  
visual
- Fotoisomerização:  
transição  $\pi-\pi^*$ ; 200 ps;  
 $\phi = 2/3$ ;  
em 0,25-0,50 ms  
fica o rodopsina activado

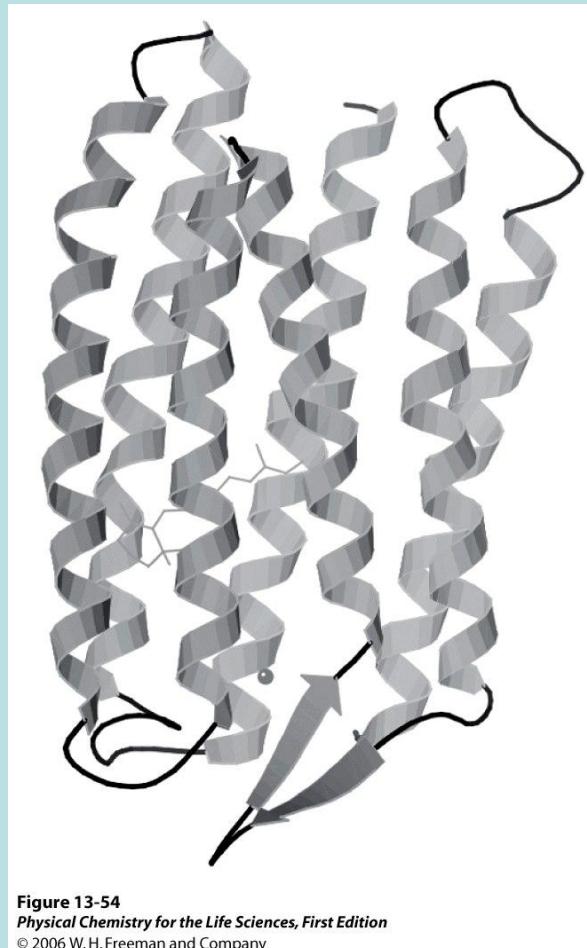
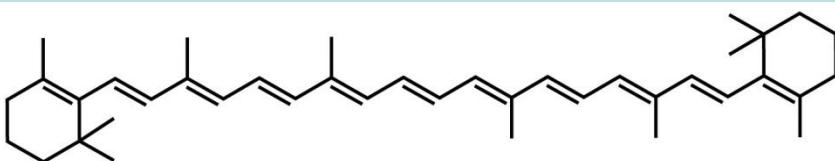


Figure 13-54  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

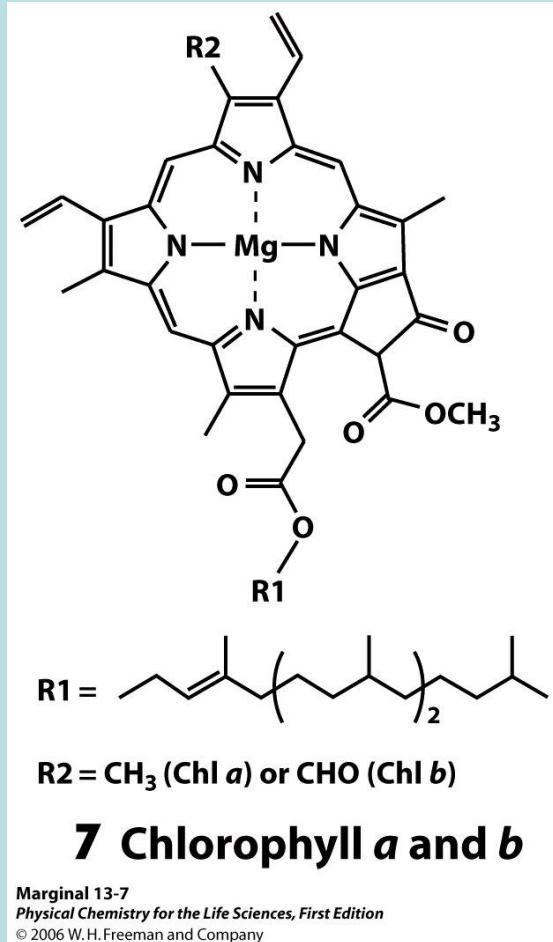
# Fotossíntese

- Complexos de pigmentos com proteínas
  - A luz excita a molécula a um estado singuleto
  - 0,1 – 5 ps – transferência por Förster
  - Passados 100-200 ps, +90% da energia chega ao centro da reacção
  - Excita-se o dímero de clorofila *a*
  - Transfere-se a energia a feofitina *a* (3 ps)
  - Transferência mais rápida que a emissão (clorofila *a*: 5 ns)



**8  $\beta$ -Carotene**

Marginal 13-8  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

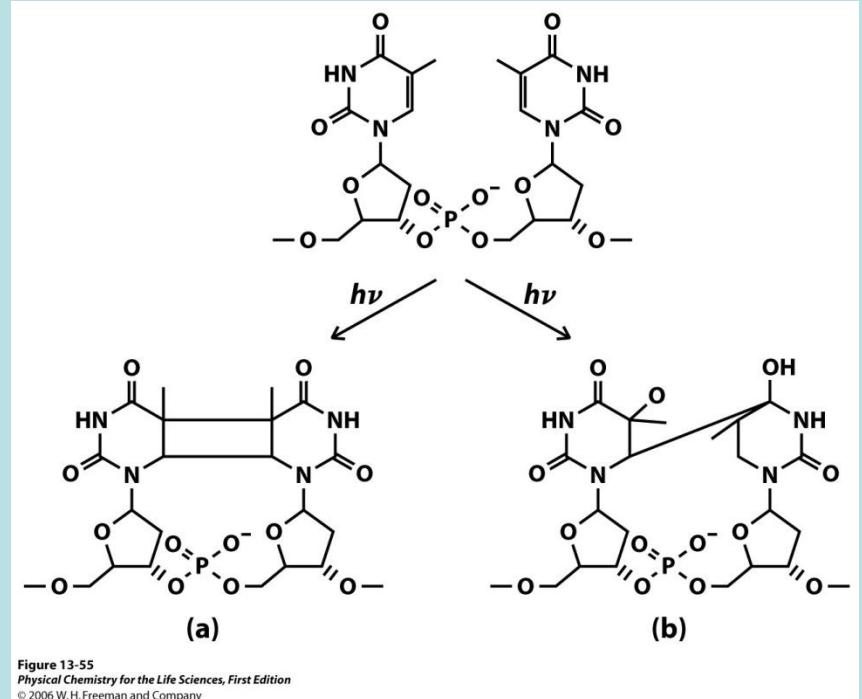


**7 Chlorophyll *a* and *b***

Marginal 13-7  
*Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition*  
© 2006 W.H. Freeman and Company

# Danos a ADN

- Fotodimerisação de timinas
- Existem mecanismos de reparação e protecção



# Terapia fotodinâmica

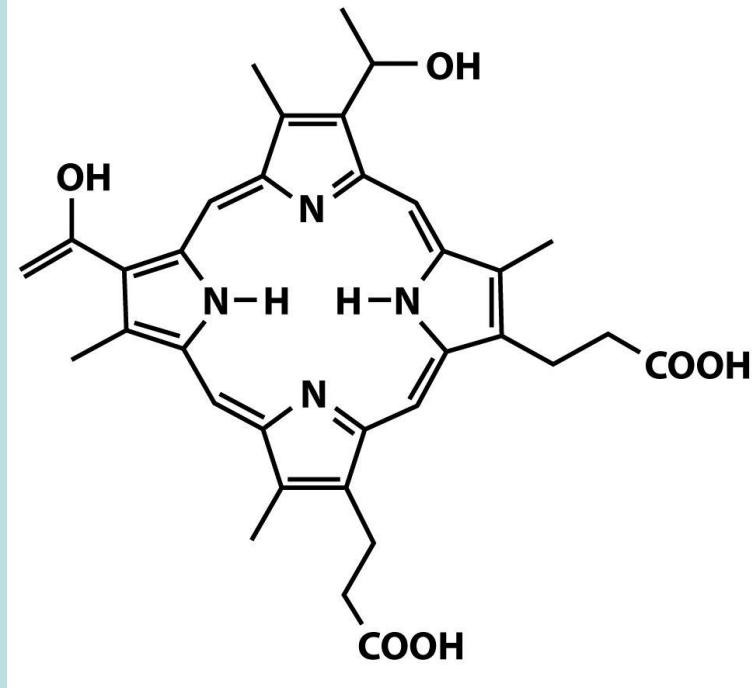
- O medicamento sensibiliza o oxigênio singuleto

Absorção:  $P + h\nu \rightarrow P^*$

Crusamento intersistemas:  $P^* \rightarrow {}^3P$

Fotossensibilização:  ${}^3P + {}^3O_2 \rightarrow P + {}^1O_2$

Oxidação:  ${}^1O_2 + \text{reagentes} \rightarrow \text{produtos}$



9 Hematoporphyrin

Marginal 13-9  
Physical Chemistry for the Life Sciences, First Edition  
© 2006 W.H. Freeman and Company