

# INSTRUMENTO PARA LA MEDICIÓN DE BIRREFRINGENCIA Y DICROÍSMO EN MACROMOLECULAS Y COLOIDES

J. A. Bertolotto, P. A. Willging, L. A. Pugnaroni, H. D. Bustos  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa.  
Avenida Uruguay 151, (6300) Santa Rosa, La Pampa.

Se adapta un espectrofotómetro ultravioleta-visible con el fin de efectuar medidas de birrefringencia y dicroísmo eléctricos en soluciones de macromoléculas y coloides. Se adiciona al espectrofotómetro, un dispositivo óptico y un sistema de detección digital. Los datos se analizan mediante un software diseñado al efecto.

## I. INTRODUCCIÓN

En un instrumento para medir propiedades electro-óptica se envía un campo eléctrico a una muestra y se determina el cambio en las propiedades ópticas que se inducen en la misma. Ejemplo de estas propiedades son la birrefringencia y el dicroísmo eléctrico.

El análisis de la birrefringencia en función del campo eléctrico, permite obtener propiedades eléctricas (polarizabilidad, momento dipolar permanente) y propiedades ópticas (polarizabilidad óptica) de las moléculas en solución. El estudio del decaimiento de la birrefringencia o del dicroísmo eléctrico con el tiempo, permite determinar el tamaño de las moléculas. Las curvas de dicroísmo en función del campo eléctrico se utilizan en la determinación de la orientación de los grupos cromóforos con respecto al eje principal de la molécula<sup>1</sup>.

Han sido descritos en la bibliografía distintos instrumentos para medir la birrefringencia y el dicroísmo eléctrico en soluciones macromoleculares<sup>1-2</sup>.

En este trabajo se describe un nuevo sistema, en el cual se adapta de un espectrofotómetro ultravioleta-visible para medir la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de soluciones macromoleculares o suspensiones coloidales. Además, se emplea un sistema de detección compuesto por una cámara digitalizadora, que registra las señales de fotocorriente desde un osciloscopio y la envía a una computadora para ser procesadas.

## II. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

Un instrumento corriente para medir el dicroísmo eléctrico consta de una fuente de luz, un monocromador y un polarizador que envían luz planopolarizada monocromática a una solución colocada en la celda de Kerr. Se mide el cambio óp-

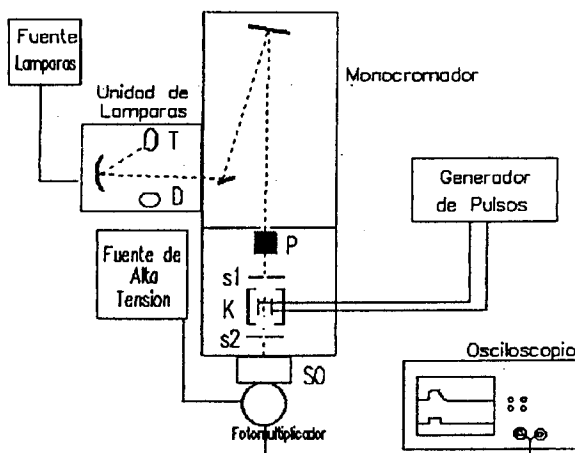
tico que ocurre al aplicar el campo eléctrico mediante un fotomultiplicador y sistema amplificador-detector (osciloscopio, registrador de transitorios).

Para medir la birrefringencia eléctrica se agrega al sistema anterior una lámina cuarto de onda y un analizador<sup>2</sup>.

El campo eléctrico aplicado a la muestra suele ser de corta duración y tener forma de pulso rectangular o bipolar o un tren sinusoidal.

Para procesar las señales electro-ópticas, comúnmente se emplea una computadora que recibe los datos digitalizados a través de una interfase conectada a un registrador de transitorios.

Un espectrofotómetro estándar UV-Visible, posee gran parte de los elementos necesarios para construir un equipo de electro-óptica, esto es: el sistema de iluminación, el cual está compuesto por una unidad de lámparas (tungsteno para la región



P: polarizador, SO: sistema óptico, K: celda de Kerr, S1, S2: rendijas, T: lámpara de Tungsteno, D: lámpara de Deuterio.

Fig. 1: Esquema general del equipo de electro-óptica.

visible y deuterio para el ultravioleta); el monocromador; la unidad de celdas y el fotomultiplicador con la fuente de alta tensión (Ver Fig. 1).

Para poder realizar las mediciones de birrefringencia y dicroísmo se efectúan sobre un espectrofotómetro marca Metrolab modelo RC-250, las siguientes modificaciones:

a) Se ubica a la entrada del haz de luz en el compartimento de celdas, un polarizador de Glan-Taylor (P) de 1 cm<sup>2</sup> de abertura que transmite en el ultravioleta-visible,

b) En un portaceldas de espectrofotómetro se ubica una celda de Kerr (K)<sup>1</sup>. Esta consta de dos electrodos planos de platino de 1,5 cm x 1,0 cm mantenidos paralelos y a una distancia de 0,15 cm mediante un soporte y espaciadores de teflón. Este soporte se introduce en una cubeta de espectrofotómetro de 1,00 cm de trayectoria óptica que contiene la solución en estudio. Sobre el portaceldas se fijan dos rendijas (s1 y s2) con el fin de diaframar el haz luminoso que debe pasar por el espacio entre los dos electrodos.

c) Se reemplaza el soporte que contiene al fotomultiplicador y al circuito pre-amplificador del espectrofotómetro por otro dispositivo, que contiene el resto del sistema óptico para medir la birrefringencia eléctrica, un fotomultiplicador y un circuito preamplificador adecuado para enviar las señales de fotocorriente a un osciloscopio (ver Fig. 2).

d) Para inducir la birrefringencia eléctrica en la muestra ubicada en la celda de Kerr se emplea un generador de pulsos.

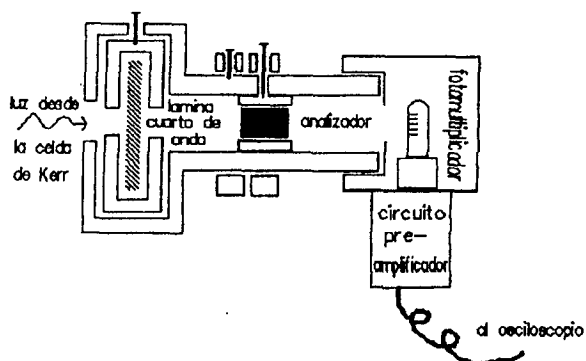


Fig. 2: Dispositivo óptico para medir la birrefringencia eléctrica y sistema de detección.

Según el tipo de análisis que se desea realizar, se usan distintas formas de campo: un solo pulso rectangular<sup>3</sup> o dos pulsos rectangulares inmediatamente consecutivos de polaridad opuesta<sup>4</sup>.

e) Para registrar las señales obtenidas en el osciloscopio se fotografía con una cámara digitalizadora ELECTRIM EDC-1000 que envía a la computadora una matriz digital de la imagen que se encuentra en la pantalla del osciloscopio.

### III. FUNCIONAMIENTO

Para realizar medidas de dicroísmo eléctrico se coloca el polarizador de manera que la orientación del plano de polarización coincida con la dirección del campo eléctrico en la celda de Kerr. Se le aplica un campo eléctrico a la solución en estudio y se mide el cambio de intensidad luminosa ( $\Delta I$ ) en el osciloscopio.

El dicroísmo ( $\Delta A$ ) se calcula mediante la relación:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{-1.5}{A} \log \left( 1 + \frac{\Delta I}{I} \right) \quad (1)$$

donde  $A$  es la absorbancia de la solución  $I$  es la intensidad de luz transmitida por la muestra (ambas en ausencia de campo eléctrico).

Para medir la birrefringencia  $\Delta n$ , se orienta el polarizador (P) de manera que su plano de polarización forme 45 grados con el campo eléctrico de la celda de Kerr, el eje lento de la lámina cuartzo de onda se ubica a 135 grados con respecto al campo eléctrico y el analizador volcado un ángulo  $\alpha$  con respecto a la posición de esta última. Se aplica un campo a la solución en estudio y se registra en el osciloscopio el cambio en la intensidad luminosa  $\Delta I_\delta$ . Finalmente, la birrefringencia eléctrica se determina mediante la ecuación:

$$\frac{\Delta I_\delta}{I_\delta} = \frac{\cos 2\alpha - \cos (2\alpha + \delta)}{2 \sin^2 \alpha} \quad (2)$$

con 
$$\delta = \frac{2\pi\Delta n}{\lambda}$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz empleada, es la intensidad de luz en ausencia de campo eléc-

tricio y l el trayecto óptico dentro de la muestra.

#### IV. EJEMPLO DE APLICACIÓN DEL INSTRUMENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

##### BIRREFRINGENCIA EN UNA SOLUCIÓN DE ADN

Para verificar el funcionamiento del equipo se midió la birrefringencia eléctrica de una solución de ADN de timo de ternera altamente polimerizado, con una concentración de 25 mg/dl en NaCl 1 mM. En la Fig. 3 se muestra la señal entregada por el fotomultiplicador al osciloscopio, que se utilizó para la determinación de la birrefringencia eléctrica, en el caso antes citado.

El campo eléctrico aplicado en esta experiencia es de 1,8 KV/cm, con una duración de 2 ms. El valor de  $\Delta I$  en el estado estacionario es de 0,073 V. Los demás parámetros adoptan los siguientes valores:  $\alpha = 5$  grados,  $I_{\alpha} = 10,08$  V,  $\lambda = 524$  nm.

El valor que se obtiene para la birrefringencia eléctrica, en el estado estacionario, mediante la ecuación (2) es:  $\Delta n = 5,24 \times 10^{-8}$ .

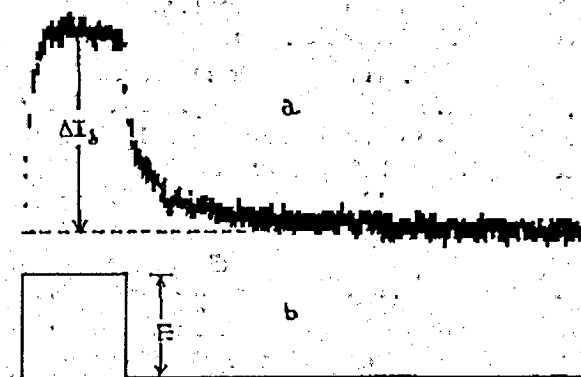


Fig. 3: a) Señal de fotocorriente de la muestra de ADN. b) Campo eléctrico aplicado.

#### V. ANÁLISIS DE LA RELAJACIÓN

Como se observa en la Fig. 3, a partir del corte del campo eléctrico, se produce una relajación

de la birrefringencia de la muestra. Para poder analizar la curva de decaimiento de la birrefringencia con el tiempo, después de quitar el campo eléctrico a la celda de Kerr, es necesario un sistema que registre esta curva. En nuestro caso usamos una cámara digitalizadora (EDC-1000 ELECTRIM) que toma una fotografía de la traza de la curva en el osciloscopio y la envía a la computadora, en forma digitalizada. Por medio del programa VGACAM, que acompaña a la cámara, se toman las fotografías y se archivan como ficheros de imágenes. Cada byte del fichero contiene un número de 0 a 255 que indica el nivel de brillo en la posición correspondiente de la fotografía (0=negro, 255=blanco).

Un programa desarrollado en QUICKBASIC, recupera los datos del archivo y los ubica en dos arreglos que guardan las coordenadas  $x$  e  $y$  de la curva en la foto, buscando los puntos de mayor iluminación. Una vez que se conocen las coordenadas de los distintos puntos de la curva, en forma discreta, el programa ajusta (usando el método de los cuadrados mínimos) una función de la forma

$$\frac{\Delta n(t)}{\Delta n_0} = \sum_{i=1}^n b_i e^{-t/\tau_i} \quad (3)$$

donde  $\Delta n(t)$  es la birrefringencia eléctrica en el tiempo  $t$  y  $\Delta n_0$  es la birrefringencia en el estado estacionario ( $\Delta n(0)$ ). El motivo de ajustar el decaimiento con una suma de exponenciales, se debe a que suponemos que la muestra está compuesta por  $n$  especies (normalmente de 1 a 3) con tiempos de relajación  $\tau_i$  y contribución al total de la muestra  $b_i$ . En el caso del ADN de timo de ternera se obtiene:

$$\tau_1 = 3,14 \cdot 10^{-3} \text{ s}, \tau_2 = 2,42 \cdot 10^{-4} \text{ s}, b_1 = 0,38 \text{ y } b_2 = 0,65.$$

#### REFERENCIAS:

1. E. Fredericq and C. Houssier, "Electric dichroism and electric birefringence", Clarendon Press, Oxford (1973).
2. C. Houssier and Ch. T. O'Konski, "Molecular Electro-Optics". Ed. S. Krause, Plenum Press, New York, 309-339 (1981).
3. J. A. Bertolotto y E. M. Farfás de la Torre, Revista Telegráfica Electrónica 871, 218-220 (1986).
4. J. A. Bertolotto, E. M. Farfás de la Torres y G. Corral, Revista Telegráfica Electrónica 888, 1590-1592 (1987).