

# CÁLCULO DEL DICROISMO LINEAL ELÉCTRICO DE SOLUCIONES DILUIDAS DE FRAGMENTOS DE ADN

G.M. Corral\* y J.A. Bertolotto

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de La Pampa  
Avenida Uruguay 151 (6300) – Santa Rosa – La Pampa - Argentina  
e-mail: gcorral@exactas.unlpam.edu.ar

Se calcula el dicroísmo lineal eléctrico, en el estado estacionario, para una solución de fragmentos de ADN modelizados como moléculas varillas quebradas (MVQ) rígidas. Éstas tienen las siguientes características: cada MVQ está formada por dos varillas rígidas de longitud  $L$ , con un ángulo  $\chi$  entre ellas, carga eléctrica uniformemente distribuida en los dos brazos y un tensor polarizabilidad eléctrica. Cada brazo está constituido por  $N$  monómeros, con un tensor probabilidad de transición medio por monómero. Se cuantifica la intensidad de luz absorbida por cada MVQ, para luz polarizada paralela y perpendicular al campo eléctrico orientador. Para ello se calcula la absorción de cada monómero y se suma sobre toda la molécula. El dicroísmo de la solución de MVQ se calcula a partir de la anisotropía en la absorción de cada molécula, integrando sobre todas las orientaciones, empleando la función de distribución orientacional característica de este sistema. Para considerar la flexibilidad de las moléculas, se supuso a la solución de moléculas flexibles como una mezcla de MVQ rígidas con una distribución de conformaciones. En un trabajo previo se resolvió la ecuación de Fokker-Planck del sistema, para este caso, y se obtuvo la función de distribución conformacional,  $G(\chi)$ , para el estado estacionario. Empleando  $G(\chi)$ , se promedia el dicroísmo reducido para una solución de MVQ rígidas de diferentes conformaciones. Comparamos los resultados de esta teoría con curvas experimentales de dicroísmo lineal eléctrico en función del campo eléctrico para soluciones acuosas de fragmentos de ADN.

It is calculated the electric linear dichroism, in the stationary state for aqueous solutions of DNA fragments modeled as broken rod molecules (BRM). These have the following characteristics: each BRM is formed by two rigid rods, with an  $L$  length, forming a  $\chi$  angle between them,  $q$  electric charge uniformly distributed in the two arms and an electric polarizability tensor  $\alpha^E$ . Each arm is formed by  $N$  monomers, with a transition probability tensor average,  $\mu^2$ , by monomer. It is quantified the intensity of the absorbed light by each BRM, for light incident polarized parallel and perpendicular to the electric field orientation. So it is calculated the absorption of each monomer and it is added over the whole molecule. The dichroism of BRM solution is calculated from the anisotropy in the absorption of each molecule, integrating over all the orientations, employing the characteristic orientational distribution function of the system. For considering the flexibility of molecules, it is supposed the flexible molecules solution as a mixture of rigid BRM with a distribution of conformations. In a previous work it was solved the Fokker-Planck equation of the system, for this case, and it was obtained the conformational distribution function,  $G(\chi)$ , for the stationary state. By  $G(\chi)$ , it is averaged the reduced dichroism for a solution or rigid BRM of different conformations. We compared the results of this theory with experimental curves of electric linear dichroism as a function of the electric field for aqueous solutions of DNA fragments.

## I. INTRODUCCIÓN

El Dicroísmo Lineal Eléctrico ( $\Delta A$ ), se debe a la absorción anisotrópica de luz linealmente polarizada, en un conjunto de moléculas, orientadas por medio de un campo eléctrico. La orientación es producida por la interacción del campo eléctrico con el dipolo eléctrico molecular permanente o inducido<sup>(1)</sup>. Para partículas con forma tal que tienen un acoplamiento entre el movimiento de rotación y traslación, existe un cambio de orientación debido al movimiento electroforético<sup>(2)(3)</sup>. Si se ilumina la molécula orientada con luz linealmente polarizada, cuya longitud de onda es la apropiada para excitar los grupos cromóforos, desde el estado fundamental a un estado excitado, en general, la molécula mostrará absorción selectiva, dando como resultado que la absorbancia de luz polarizada

perpendicular a la dirección del campo eléctrico orientador es diferente de aquella para la dirección paralela.

En espectroscopia de absorción de luz polarizada se utiliza comúnmente una cantidad adimensional llamada Dicroísmo Lineal Reducido, que se define como el cociente entre el Dicroísmo Lineal Eléctrico, medido para una longitud de onda, una muestra y un camino óptico dados, y la correspondiente absorbancia isotrópica ( $A$ ) de la misma muestra cuando las partículas están orientadas al azar.

El dicroísmo puede ser positivo o negativo, dependiendo de los valores de las componentes del momento de transición asociado con la banda de absorción.

Holcomb y Tinoco<sup>(4)</sup>, que calculan la función de orientación para la birrefringencia eléctrica en el estado

\* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

estacionario para un modelo molecular general con polarizabilidades eléctricas y ópticas y un momento dipolar permanente con cualquier dirección, extienden su teoría al dicroísmo eléctrico reemplazando directamente el tensor polarizabilidad óptica de las moléculas por el tensor probabilidad de transición.

Schellman<sup>(5)</sup> hace la teoría cuántica básica de la absorción de luz molecular, tratando entre otros temas el dicroísmo lineal.

En este trabajo nos basamos en la referencia (5) para desarrollar la teoría del dicroísmo para una solución de partículas tipo moléculas varilla quebrada (MVQ) rígidas compuestas por monómeros caracterizados por un momento de transición ubicado en el plano perpendicular al eje de simetría de cada brazo.

Para explicar mediciones espectroscópicas, se debe calcular el efecto de la luz sobre una molécula. Si el grupo cromóforo tiene una dimensión máxima de 2 nm y la longitud de onda de la luz incidente es mayor que 200 nm, entonces se supone que no existe variación espacial del campo eléctrico y sólo se considera la variación temporal.

Se supone que el sistema se encuentra inicialmente en el estado  $\psi_a$ , que es un autoestado del Hamiltoniano independiente del tiempo, con energía  $E_a$ . Después de un cierto tiempo de exposición a la luz, algunos monómeros pasan a estar en otros estados diferentes. Se calcula la velocidad a la cual la luz provoca las transiciones entre  $\psi_a$  y otros estados. Suponemos que el monómero puede estar sólo en dos estados  $\psi_a$  y  $\psi_b$ .

La energía absorbida por monómero por segundo corresponde a la velocidad de cambio de la probabilidad de que un monómero absorba un fotón para saltar de estado, en respuesta a la iluminación con radiación centrada alrededor de la frecuencia  $\omega_{ab}$  y está dada por

$$w_m = \frac{\pi |\vec{\mu} \cdot \vec{E}_0|^2}{2\hbar} \cdot \delta(\omega_{ab} - \omega) \quad (1)$$

Esta es la fórmula estándar para una perturbación periódica, donde  $\vec{E}_0 = \vec{v}_e E_0$ , es el vector amplitud máxima del campo eléctrico, que describe la dirección de polarización de la luz.

Los factores que determinan la forma de las bandas de absorción electrónica de moléculas que contienen más de dos átomos son extremadamente complejos, especialmente en solución. Por ello es conveniente introducir una función peso normalizada  $\rho(\omega_{ab})$  para la probabilidad de una transición dentro de las numerosas transiciones electrónicas  $a \rightarrow b$ . Cada transición monocromática resulta pesada por la "densidad de transición" para dar:

$$w = \frac{\pi |\vec{\mu} \cdot \vec{v}_e|^2 E_0^2 \omega \rho_m(\omega)}{2\hbar} \quad (2)$$

la energía promedio absorbida por monómero por segundo.

Para calcular el coeficiente de extinción se aplica la ley de Lambert-Beer en su forma diferencial que está dada por:

$$\frac{\delta I}{I} = -2.303 \epsilon C \delta z \quad (3)$$

donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción,  $C$  la concentración,  $\delta z$  es el espesor de la muestra sobre la cual la luz incide normalmente,  $I$  es la intensidad de la radiación en  $\text{ergios.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y  $\delta I = w \left( \frac{N_A C}{1000} \delta z \right)$  con

$N_A$ : número de Avogadro.

Entonces, el coeficiente de extinción está dado por

$$\epsilon = \frac{N_A w}{2303 I} \quad (4)$$

El dicroísmo lineal se define en términos de diferencias de coeficientes de extinción, de la siguiente manera:

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{//} - \epsilon_{\perp} = \frac{N_A}{2303 I} (w_{//} - w_{\perp}) \quad (5)$$

Por otro lado, la intensidad media es:

$$I = \frac{cnE_0^2}{8\pi} \quad (6)$$

donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío y  $n$  es el índice de refracción.

## II. TEORIA

### Modelo

Utilizamos un modelo MVQ rígida, formado por dos varillas rígidas abisagradas, cada una de longitud  $L$ , que forman un ángulo  $\chi$  entre ellas, con una distribución de carga  $q$  uniforme y un tensor polarizabilidad eléctrica  $\vec{\alpha}_E$ . Cada brazo está constituido por  $N$  monómeros, con un tensor probabilidad de transición medio por monómero  $\mu^2$ .

Se supone que el sistema de laboratorio se encuentra ubicado en un sistema de referencia  $xyz$ . Se ubica el campo eléctrico orientador en la dirección  $z$ .

Se supone que la MVQ se encuentra ubicada en un sistema de referencia  $x'y'z'$  con origen en la bisagra de la misma. Se ubica la MVQ en el plano  $x'z'$ , siendo el eje  $x'$  la bisectriz del ángulo  $\chi$ .

Se supone que el momento de transición de cada monómero es perpendicular al eje de cada brazo y que se encuentra ubicado en el plano  $x''y''$ , con respecto a un sistema de referencia  $x''y''z''$ , con  $z''$  paralelo al eje longitudinal del brazo.

### Parámetros físicos

El Dicroísmo Lineal Eléctrico de macromoléculas en solución depende de las propiedades eléctricas de la molécula, tales como la polarizabilidad eléctrica, la carga electroforética y el momento dipolar permanente, de las propiedades hidrodinámicas, como el tensor difusión rotacional y el tensor difusión acoplamiento traslación rotación, y de las propiedades ópticas, como la probabilidad de transición. Aquí suponemos que las

MVQ no son polares, pero sí polarizables. Además, la polarizabilidad eléctrica depende de la longitud  $L$ , del ángulo  $\chi$ , de la constante de polarizabilidad  $K^{(6)}$ , y también es una función decreciente, con respecto a la fuerza iónica  $F_1$ , sobre un amplio rango de concentración de contraiones<sup>(7)</sup>.

### Cálculo de la probabilidad de transición

La parte orientacional de la ecuación (4) está comprendida en  $w$  (ec. (2)) y es  $|\vec{v} \cdot \vec{\mu}|^2 = |\mu_z|^2$  para luz incidente linealmente polarizada paralela al eje  $z$  (eje paralelo al campo eléctrico orientador). Para una muestra de moléculas orientadas aleatoriamente la contribución de cada MVQ al coeficiente de extinción, promediada sobre todas las orientaciones, es  $N \frac{4}{3} \mu^2$ .

De las ec.(2), (4) y (6), el coeficiente de extinción resulta:

$$\varepsilon = N \cdot \frac{4}{3} \mu^2 \frac{4\pi^2 \lambda P(\lambda) N_A}{2303 \hbar n c} \quad (7)$$

donde se reemplazó  $\omega\rho(\omega)$  por  $\lambda P(\lambda)$ , siendo  $\lambda$  la longitud de onda de la luz incidente. La función  $P(\lambda)$  tiene la forma de la banda de absorción y además está normalizada, es decir que  $\int P(\lambda) d\lambda = 1$ .

La ley de Lambert Beer en su forma integral se expresa como

$$A = IC\varepsilon \quad (8)$$

donde  $A$  es la absorbancia de la muestra,  $l$  el camino óptico y  $C$  la concentración. Esto permite calcular la probabilidad de transición  $\mu^2$  a partir de una curva de absorbancia conocida, de la siguiente manera:

$$\mu^2 = \left( \frac{2303 \hbar n c}{4\pi^2 \lambda P(\lambda) N_A} \right) \left( \frac{3}{4N} \right) \left( \frac{A}{IC} \right) \quad (9)$$

### Cálculo del dicroísmo

El dicroísmo de la solución se calcula a partir de la anisotropía en la absorción de cada MVQ, integrando sobre todas las orientaciones, empleando la función de distribución orientacional característica de este sistema. En un trabajo previo<sup>(3)</sup>, se obtuvo ésta última. Para ello se planteó la ecuación de Fokker-Planck de la misma y se la resolvió mediante el método de perturbaciones. En la migración, bajo la acción del campo eléctrico, se tuvieron en cuenta los efectos hidrodinámicos sobre las MVQ, tales como la electroforesis y el acoplamiento traslación rotación. Se encontró que la función de distribución orientacional, para soluciones de MVQ, depende, además de la orientación, de la carga electroforética, de la polarizabilidad eléctrica, del campo eléctrico aplicado, del tensor de difusión rotacional y del tensor de difusión acoplamiento traslación rotación.

De las ec. (2), (4) y (6) se obtiene:

$$\Delta\varepsilon = \frac{8\pi N_A}{2303 n c E_0^2} (w_{//} - w_{\perp}) \quad (10)$$

Siendo:

$$w_{//} = \frac{\pi E_0^2 \lambda \mu^2 P(\lambda)}{2\hbar} Z \quad (11a)$$

$$w_{\perp} = \frac{\pi E_0^2 \lambda \mu^2 P(\lambda)}{2\hbar} X \quad (11b)$$

Donde  $X$  y  $Z$  contienen la información orientacional de la interacción del momento de transición con el campo eléctrico paralelo al eje  $x$  y  $z$ , respectivamente, en el sistema de la MVQ.

De las ecuaciones (8), (10), (11a) y (11b) resulta

$$\Delta A = \frac{4\pi^2 N_A}{2303 n c \hbar} (IC) (N \lambda P(\lambda) 4\mu^2) (\Lambda_{//} - \Lambda_{\perp}) \quad (12)$$

donde  $\Lambda_{//}$  y  $\Lambda_{\perp}$  son magnitudes que resultan de la integración sobre todas las orientaciones, de la absorción en las direcciones paralela y perpendicular al campo eléctrico orientador.

Entonces

$$\frac{\Delta A}{A} = 3(\Lambda_{//} - \Lambda_{\perp}) \quad (13)$$

### Consideración de la flexibilidad de las moléculas

En un trabajo previo<sup>(3)</sup>, se supuso a la solución de moléculas flexibles como una mezcla de MVQ rígidas con una distribución de conformaciones. La función de distribución conformacional para el estado estacionario  $G(\chi)$  resulta de resolver la ecuación de Fokker-Planck del sistema siendo su expresión la siguiente:

$$G(\chi) = \sqrt{\frac{\kappa}{2\pi kT}} \exp\left(-\frac{\kappa(\chi - \pi)^2}{2kT}\right) \quad (14)$$

donde  $\kappa$  es la constante elástica de la varilla.

El dicroísmo reducido para una solución de MVQ rígidas de diferentes conformaciones se promedia empleando  $G(\chi)$ .

### III. RESULTADOS

La curva de absorbancia del gráfico 1, que se obtuvo para moléculas de ADN sonicado de 130 nm de longitud de cadena, con una concentración de  $1.31 \times 10^{-4}$  mol/l se puede aproximar con la siguiente distribución gaussiana:

$$A = 0.857162253 \times \exp\left(-0.009164158 \times (\lambda - 260.61)^2\right)$$

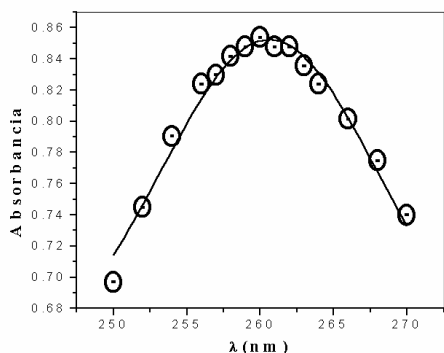


Gráfico 1. Absorbancia para ADN sonificado 4.4 mg/dl

Por lo tanto, la densidad de transición resulta:

$$P(\lambda) = 6.7691 \times 10^{-2} \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{\pi}} \exp\left(-9.1642 \times 10^{-3} (\lambda - 260.61)^2\right)$$

para una molécula de  $L = 65\text{nm}$  que corresponde a  $N = 192$  monómeros por brazo de cada MVQ.

De esta manera se obtiene, de la ecuación (9) que la probabilidad de transición es:  $\mu^2 = 7.38 \times 10^{-36} (\text{esu.cm})^2$ , es decir que  $\mu = 2.7166 \times 10^{-18} \text{esu.cm} = 2.72 \text{debye}$ .

#### Comparación de valores teóricos y experimentales del dicroísmo lineal eléctrico

De la teoría se obtiene que  $(\Lambda_{//} - \Lambda_{\perp})$  es un polinomio de grado cuatro en potencias del campo eléctrico orientador. Se compara este ajuste con los valores experimentales obtenidos por Porschke<sup>(8)</sup> para fragmentos de ADN que se muestran en el gráfico 2.

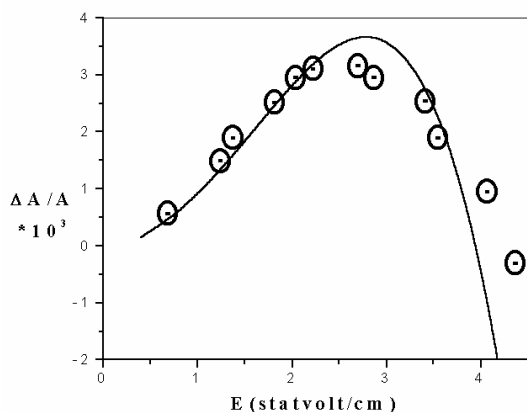


Gráfico 2. Dicroísmo lineal eléctrico reducido en función del campo eléctrico aplicado. Se comparan valores teóricos y experimentales. ⊖ valores experimentales, para fragmentos de ADN con 587 pares de bases (2000 Å), fuerza iónica  $F_I = 2.4 \text{mM}$ ; \_\_\_\_\_ Curva teórica.

Para realizar la curva de ajuste se toman los siguientes valores:

$K = 5.7 \times 10^{-6} \text{cm}$  para la constante de polarizabilidad y  $q = -7 \times 10^{-8} \text{statC}$  para la carga de la MVQ y  $\kappa = 2.5 \text{gcm}^2/\text{s}^2$ .

#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para interpretar la dependencia del dicroísmo reducido con el campo eléctrico, para ADN en solución acuosa, se puede utilizar la expresión obtenida para el dicroísmo lineal eléctrico de MVQ debido a la interacción entre el momento dipolar eléctrico inducido y el campo eléctrico aplicado, y el efecto electroforético. El modelo predice valores positivos del dicroísmo reducido para campos eléctricos pequeños, y cambia a valores negativos al aumentar el mismo, para ciertos valores de la constante de polarizabilidad eléctrica y de la carga que son los característicos del ADN en solución acuosa, para la fuerza iónica utilizada. La desviación de la predicción teórica respecto de los valores experimentales podría deberse a que el ajuste fue realizado para moléculas de 200 nm para las cuales pueden existir en el conjunto otras conformaciones diferentes de la MVQ que no contribuyen al dicroísmo, o contribuyen en menor proporción por ser acoplamiento traslación rotación menor o nulo.

Con nuestro modelo obtenemos una expresión del dicroísmo lineal eléctrico que tiene como parámetros  $\mu^2$ , la carga eléctrica y el tensor polarizabilidad eléctrica. El primer parámetro se puede ajustar con un simple experimento de espectroscopía de absorción y los dos últimos mediante ajuste entre las curvas teóricas y experimentales de dicroísmo vs. el campo eléctrico. De esta manera nos independizamos de la difícil obtención experimental del dicroísmo de saturación a campo infinito como se emplea habitualmente en las técnicas electro-ópticas de macromoléculas y coloides.

#### Referencias

- 1 - Yamaoka K., Charney E., J. Amer. Chem. Soc. **94** 8963-8974 (1972)
- 2 - Bertolotto J.A., Roston G., Ascheri M., Campo M., Physica A **327** 185-189 (2003)
- 3 - Bertolotto J.A., Roston G., Ascheri M., Progr Colloid Polym Sci **128** 25-29 (2004)
- 4 - Holcomb D.N., Tinoco I. Jr., J. Phys. Chem. **67** 2691-2698 (1963)
- 5 - Schellman J.A., Chemical Reviews **75** (3), 323-331 (1975)
- 6 - Bertolotto J.A., Campo M., Roston G., Ascheri M., Colloids and Surfaces A **203** 167-183 (2002)
- 7 - Elias J.G., Eden D., Macromolecules **14** 410-419 (1981)
- 8 - Porschke D., Biophys. Chem. **49** 127-139 (1994)