

APLICACIÓN DEL DICROÍSMO LINEAL ELÉCTRICO REDUCIDO PARA ESTUDIAR LA INFLUENCIA DEL SORBITOL SOBRE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS DEL ADN

REDUCED ELECTRIC LINEAR DICHOISM IMPLEMENTATION TO STUDY THE SORBITOL INFLUENCE ON THE ELECTRICAL PROPERTIES OF DNA

G.M. Corral* and J.A. Bertolotto

Departamento de Física - Universidad Nacional de La Pampa
Avenida Uruguay 151 - (6300) - Santa Rosa (La Pampa) - Argentina
e-mail: gcorral@exactas.unlpam.edu.ar

Recibido 12/07/2011; aprobado 11/01/2012

Se mide el dicroísmo lineal eléctrico reducido, en función del campo eléctrico aplicado, de soluciones salinas diluidas de ADN sonificado con y sin sorbitol, en la longitud de onda correspondiente a la banda de absorción de cada complejo. Se aplica la teoría del Dicroísmo Lineal Eléctrico, desarrollada por nosotros, a partir del estudio del efecto de la luz sobre una molécula, caracterizada por grupos cromóforos. Los fragmentos de ADN se modelan como varillas quebradas rígidas, polarizables, sin carga eléctrica neta y no polares. En los cálculos estadísticos se emplea la función de distribución orientacional de Boltzmann, donde la energía es la debida a la interacción entre el momento dipolar inducido saturable y el campo eléctrico orientador. Comparando los resultados experimentales con los valores provistos por nuestra teoría obtenemos información acerca de las propiedades eléctricas del ADN bajo las condiciones de trabajo. Con los datos obtenidos estudiamos el comportamiento del momento dipolar eléctrico inducido en función del campo eléctrico aplicado, para las distintas concentraciones de sorbitol.

Palabras Claves: ADN, dicroísmo lineal eléctrico, sorbitol.

We measure reduced electric linear dichroism as function of the applied electric field of diluted saline aqueous solutions of sonicated DNA with and without sorbitol, in the corresponding wavelength of the absorption band of the complex. We apply electric linear dichroism theory, developed by us, based on the study of the light effects on a molecule, characterized by chromophore groups. We model DNA fragments as rigid, polarizable, without net electric charge and non polar bent rods. In statistical calculus the Boltzmann orientational distribution function is applied, where the energy is given by the interaction between saturable induced dipole moment and the orienting electric field. By comparing the experimental results with the values obtained by applying our theory we acquire information about the electric properties of DNA under working conditions. With the experimental data obtained for different concentrations of sorbitol, we study the behavior of the induced electric dipole moment as a function of applied electric field.

Key Word: DNA, electric linear dichroism, sorbitol.

* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

I. INTRODUCCIÓN

Cuando se aplica un campo eléctrico externo a soluciones isotrópicas de fragmentos de ADN éstas se vuelven anisotrópicas. La anisotropía es producida por la interacción del campo eléctrico con el momento dipolar inducido en la macromolécula. El coeficiente de absorción de luz linealmente polarizada perpendicular a la dirección del campo eléctrico aplicado es diferente del de la luz polarizada paralela a él. Si se ilumina un fragmento de ADN orientado, con luz linealmente polarizada cuya longitud de onda es adecuada para excitar los grupos cromóforos desde el estado fundamental a un estado excitado, la molécula mostrará absorción selectiva. Este fenómeno se conoce como Dicroísmo Lineal Eléctrico (DLE), y se define como la diferencia ($\Delta A = A_{//} - A_{\perp}$) entre la absorbancia de luz polarizada paralela ($A_{//}$) y perpendicular (A_{\perp}) al campo eléctrico aplicado, a una longitud de onda dada.

El estudio del DLE provee información acerca de la naturaleza y la orientación del momento dipolar de transición responsable de la absorción, con respecto al campo eléctrico orientador. El DLE puede ser positivo o negativo, dependiendo del valor de las componentes del momento de transición asociado con la banda de absorción del grupo cromóforo. Para valores de campo eléctrico alto, las soluciones diluidas de fragmentos de ADN muestran DLE negativo⁽¹⁾.

En espectroscopía de absorción polarizada se utiliza comúnmente una cantidad adimensional llamada Dicroísmo Lineal Eléctrico Reducido (DLER) $\left(\frac{\Delta A}{A}\right)$, definido como el cociente entre el DLE, medido a una cierta longitud de onda para una muestra y camino óptico dados, y la absorción isotrópica correspondiente de la misma muestra orientada al azar.

El efecto del sorbitol sobre el ADN ha sido estudiado con diversas técnicas⁽²⁾⁽³⁾, pero hasta la actualidad no se han reportado estudios en este sentido realizados con electroóptica. El sorbitol ($C_6H_{14}O_6$), también llamado glucitol, es un polialcohol, higroscópico y se lo incluye en la clasificación de efectores osmóticos junto con el manitol, a diferencia de otros osmolitos orgánicos denominados zwitteriónicos. Flock et al⁽²⁾ estudiaron por NMR el efecto de diferentes osmolitos orgánicos sobre la capa de condensación del ADN. Observaron que para el caso del sorbitol la velocidad de relajación de los iones sodio aumenta en la proximidad del ADN. Propusieron que este efecto resulta de la perturbación de la dinámica del agua alrededor de la macromolécula debida a la acción de los polialcoholes y/o que proviene de la modificación de las capas de hidratación primaria o secundaria de los iones sodio involucrados. Stanley y Rau⁽³⁾ estudiaron las fuerzas físicas que gobiernan la exclusión o inclusión de solutos desde superficies macromoleculares a través de medidas de fuerzas entre macromoléculas en arreglos condensados utilizando las técnicas de estrés osmótico y difusión de rayos X. Concluyeron que las fuerzas que estructuran el agua dominan la interacción entre estos solutos y las macromoléculas. Encontraron que los polialcoholes,

tales como el sorbitol, muestran una inclusión aparente en los pequeños espacios entre las hélices. Entonces, una cierta cantidad de moléculas de agua serían reemplazadas ya que no tendrían el complemento normal de puentes hidrógeno. Es decir que los polialcoholes interactúan sólo indirectamente con el ADN a través de una frustración en la estructuración del agua, y no por fuerzas directas entre ADN y soluto.

En trabajos previos⁽⁴⁾⁽⁵⁾ hemos desarrollado la teoría del DLE, desde un punto de vista cuántico basándonos en un trabajo de Schellman⁽⁶⁾, estudiando el efecto de la luz sobre una molécula caracterizada por grupos cromóforos.

En el presente trabajo estudiamos el efecto del sorbitol sobre los fragmentos de ADN en solución, utilizando el DLER. Primero desarrollamos una teoría específica del DLER, modelando los fragmentos de ADN como varillas quebradas rígidas con un momento dipolar eléctrico inducido saturable.

Obtenemos una expresión para el DLER como función del campo eléctrico aplicado, teniendo como parámetros de ajuste el coeficiente de polarizabilidad a campo nulo y el campo eléctrico de transición, que surgen del modelo utilizado para el momento dipolar eléctrico inducido saturable.

Medimos el DLER en función del campo eléctrico aplicado, para soluciones diluidas de ADN sonificado, para varias concentraciones de sorbitol.

Comparando los resultados experimentales con los valores provistos por nuestra teoría obtenemos información acerca de las propiedades eléctricas del ADN bajo las condiciones de trabajo.

Con los datos obtenidos estudiamos el comportamiento del momento dipolar eléctrico inducido en función del campo eléctrico aplicado, para las distintas concentraciones de sorbitol.

II. TEORÍA

Modelo de fragmento de ADN: VQR

El DLE de soluciones macromoleculares depende de las propiedades eléctricas y ópticas de las moléculas. Para el caso de fragmentos de ADN en solución acuosa suponemos que las moléculas no son polares pero sí polarizables.

Para interpretar las mediciones de dicroísmo, calculamos el efecto de la luz sobre cada cromóforo. En este trabajo utilizamos un modelo que considera que los grupos cromóforos están en el plano de las bases del ADN.

La teoría que aquí aplicamos fue desarrollada en trabajos previos⁽⁴⁾⁽⁵⁾, para soluciones de moléculas tipo Varilla Quebrada Rígida (VQR).

Suponemos que cada VQR está formada por dos brazos cilíndricos de longitud L , diámetro a y ángulo χ entre ellos. El diámetro a es la distancia en la cual los contraiones pueden moverse transversalmente cuando se aplica un campo eléctrico a la varilla.

La figura 1 muestra un esquema de la VQR y los sistemas de coordenadas usados. Sea xyz el sistema de coordenadas de laboratorio. El campo eléctrico

orientador se aplica en la dirección z . La VQR se ubica en el plano $x'z'$, en un sistema de coordenadas $x'y'z'$ cuyo origen coincide con el vértice del ángulo χ . Cada brazo de la VQR está ubicado en otro sistema de coordenadas, $x''y''z''$. El vector momento dipolar de transición y el eje z'' forman un ángulo α entre ellos (para el caso del ADN $\alpha = 90^\circ$) y β es el ángulo que permite proyectarlo sobre los ejes $x''y''$, siendo

$$\vec{\mu} = \mu(\sin\alpha \cos\beta \hat{x}'' + \sin\alpha \sin\beta \hat{y}'' + \cos\alpha \hat{z}'') \quad (1)$$

la expresión general para el momento dipolar de transición, donde \hat{x}'' , \hat{y}'' y \hat{z}'' son los versores unitarios ortogonales del sistema $x''y''z''$.

Caracterizamos las moléculas por medio de un tensor probabilidad de transición $[T] = \vec{\mu} \cdot \vec{\mu}$, el cual en el sistema de la molécula está dado por:

$$[T] = \mu^2 \begin{bmatrix} \sin^2 \frac{\chi}{2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (2)$$

donde μ es el módulo del vector momento dipolar de transición para cada grupo cromóforo. Aquí hemos supuesto que el vector momento dipolar de transición está ubicado al azar en el plano de las bases del ADN, que corresponde al plano $x''y''$ de nuestro modelo.

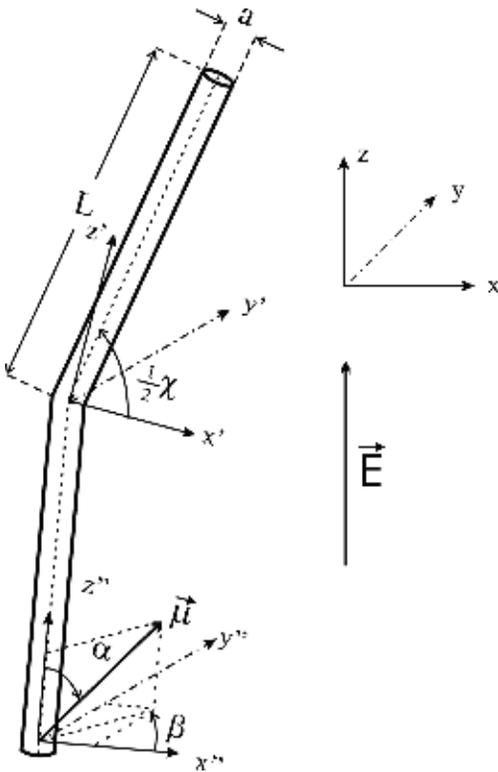


Figura 1. Esquema de la VQR con sus parámetros geométricos, momento dipolar de transición, campo eléctrico orientador \vec{E} y los sistemas de coordenadas usados en la teoría.

Las magnitudes que brindan información acerca de la interacción de la luz con los grupos cromóforos, Z y X se definen como:

$$Z = \hat{z} \cdot [T] \cdot \hat{z} \quad (3)$$

$$X = \hat{x} \cdot [T] \cdot \hat{x} \quad (4)$$

y están dadas por:

$$Z = \frac{\mu^2}{4} \left\{ (1 - \cos\chi) \cos^2\theta + \sin^2\theta \left[2 \cos^2\psi + (1 - \cos\chi) \sin^2\psi \right] \right\} \quad (5)$$

$$X = \frac{\mu^2}{16} \left\{ \begin{aligned} & -2 \cos^2\theta \left[-3 + \cos\chi + 2 \left(\cos \frac{\chi}{2} \right)^2 \cos 2\varphi \cos 2\psi \right] + \\ & 4 \sin^2\theta \left\{ (1 + \cos\chi) \sin^2\varphi + \cos^2\varphi \left[-(-1 + \cos\chi) \cos^2\psi + 2 \sin^2\psi \right] \right\} + \\ & 2 \left(\cos \frac{\chi}{2} \right)^2 \cos^3\theta \sin 2\varphi \sin 2\psi - \\ & \left(\cos \frac{\chi}{2} \right)^2 \cos\theta (-3 + \cos 2\theta) \sin 2\varphi \sin 2\psi \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

Polarizabilidad eléctrica

Consideramos que las moléculas son polarizables, de modo que las caracterizamos con un tensor polarizabilidad eléctrica $[\alpha^E]$.

En un trabajo previo⁽⁷⁾ calculamos los términos principales del tensor polarizabilidad eléctrica para una VQR. Obtuvimos que éstos términos dependen de L , a y χ en la siguiente manera:

$$\alpha_{11}^E(E) = 4\pi 8,85 \times 10^{-12} \left[2\kappa_{//}(E)L^2 \cos^2\left(\frac{\chi}{2}\right) + 2\kappa_{\perp}(E)La \sin^2\left(\frac{\chi}{2}\right) \right] \quad (7)$$

$$\alpha_{22}^E(E) = 4\pi 8,85 \times 10^{-12} 2\kappa_{\perp}(E)La \quad (8)$$

$$\alpha_{33}^E(E) = 4\pi 8,85 \times 10^{-12} \left[4\kappa_{//}(E)L^2 \sin^2\left(\frac{\chi}{2}\right) + 2\kappa_{\perp}(E)La \cos^2\left(\frac{\chi}{2}\right) \right] \quad (9)$$

Donde $\kappa_{//}$ y κ_{\perp} son los coeficientes de polarizabilidad paralelo y perpendicular, respectivamente, al eje de simetría de cada brazo de la VQR.

En la referencia⁽⁷⁾ se demostró que $\kappa_{//} = \kappa_{\perp} = \kappa$. Esto se hizo basándose en trabajos de simulación por Dinámica Browniana realizados por Antosiewicz y Porschke⁽⁸⁾, para varillas con $L = a = 10\text{nm}$. Dado que el coeficiente de polarizabilidad no depende de las dimensiones de la molécula, esta igualdad es válida para todo valor de L y a .

Momento dipolar inducido saturable

La aplicación de un campo eléctrico paralelo al eje principal del polímero induce un momento dipolar

eléctrico que depende del campo eléctrico aplicado. En una manera similar a la utilizada por Rau y Charney⁽⁹⁾, proponemos para el momento dipolar inducido la siguiente dependencia con el campo eléctrico aplicado:

$$\vec{m} = \vec{\alpha}^E(E) \cdot \vec{E} \quad (10)$$

Para campos altos y/o para largas longitudes de cadena se encuentra experimentalmente que el momento dipolar eléctrico inducido resulta constante y se han propuesto varios modelos que describen la situación.⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

Nosotros proponemos la siguiente función para el momento dipolar inducido:

$$\vec{m} = \vec{m}_s \left[1 - \exp\left(-\frac{E}{E_0}\right) \right] \quad (11)$$

donde

m_s es el momento dipolar inducido para campos muy altos (tendientes a infinito), E_0 es el valor del campo de transición, es decir, el valor del campo eléctrico para el cual $m = m_s \left(1 - \frac{1}{e}\right)$, siendo e la base de los logaritmos naturales.

La expresión (11) ajusta la dependencia de m vs E encontrada por Grycuk et al⁽¹²⁾ por medio de simulación por Dinámica Browniana aplicada a polímeros construidos en analogía a dobles hélices de ADN.

Comparando las ecuaciones (10) y (11) para el momento dipolar inducido y utilizando las ecuaciones (7), (8) y (9), suponiendo que α_{22}^E es despreciable frente a las otras componentes dado que $a \ll L$ obtenemos la siguiente expresión para el coeficiente de polarizabilidad:

$$\kappa(E) = \kappa_0 \left[\frac{1 - \exp\left(-\frac{E}{E_0}\right)}{\frac{E}{E_0}} \right] \quad (12)$$

donde κ_0 es el coeficiente de polarizabilidad a campo nulo y encontramos que el momento dipolar inducido saturable en el sistema de laboratorio está dado por:

$$m_z = 2L\kappa_0 E_0 4\pi 8,85 \times 10^{-12} \left\{ \begin{array}{l} \sin^2 \theta \sin^2 \psi \left[\begin{array}{l} L \cos^2\left(\frac{\chi}{2}\right) + \\ a \sin^2\left(\frac{\chi}{2}\right) \end{array} \right] \\ + \cos^2 \theta \left[\begin{array}{l} 2L \sin^2\left(\frac{\chi}{2}\right) + \\ a \cos^2\left(\frac{\chi}{2}\right) \end{array} \right] \end{array} \right\} \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{E}{E_0}\right) \right) \quad (13)$$

siendo θ , φ y ψ los ángulos de Euler⁽¹³⁾ que relacionan el sistema de laboratorio con el sistema de referencia de la VQR.

Función de distribución orientacional

Para calcular el DLER utilizamos la función distribución orientacional de Boltzmann, la cual está dada por:

$$f(\theta, \varphi, \psi) = \exp\left(\frac{-U}{kT}\right) \left(\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \left(\exp\left(\frac{-U}{kT}\right) \sin \theta d\theta \right) d\varphi d\psi \right)^{-1} \quad (14)$$

donde

$$U = -\left(\frac{E_0 \kappa_0}{\kappa}\right) \left(\alpha_{11}^E \sin^2 \theta \sin^2 \psi + \alpha_{22}^E \sin^2 \theta \cos^2 \psi + \alpha_{33}^E \cos^2 \theta \right) \cdot \left(E_0 - E_0 \exp\left(\frac{-E}{E_0}\right) - E \right) \quad (15)$$

es la energía necesaria para polarizar un dipolo saturable y orientarlo por medio de un campo eléctrico aplicado, obtenida siguiendo los lineamientos teóricos que utiliza Böttcher⁽¹⁴⁾. α_{ii}^E para $i = 1, 2, 3$, son los términos principales del tensor polarizabilidad eléctrica $[\alpha^E]$.

Dicroísmo lineal eléctrico reducido

En un trabajo previo⁽¹⁵⁾, calculamos la energía promedio w absorbida por cromóforo por segundo para orientación aleatoria, para luz incidente linealmente polarizada en la dirección z , y obtuvimos la siguiente expresión:

$$w(\lambda) = \frac{(E_0^L)^2 \lambda P(\lambda)}{16\pi \hbar} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (Z) \sin \theta d\theta d\varphi d\psi \quad (16)$$

donde λ es la longitud de onda correspondiente a la banda de absorción del grupo cromóforo, $P(\lambda)$ es la densidad de transición normalizada a la unidad, $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ siendo h la constante de Planck.

De las ec. (4) y (6) de la referencia⁽⁴⁾ se obtiene que el coeficiente de extinción ε de la muestra para orientación aleatoria, está dado por:

$$\varepsilon(\lambda) = \frac{8\pi N_A}{2303cn(E_0^L)^2} w(\lambda) \quad (17)$$

donde N_A es el número de Avogadro, n es el índice de refracción del medio, c es la velocidad de la luz en el vacío.

La energía absorbida promedio por cromóforo, por segundo para moléculas orientadas por el campo eléctrico, para luz incidente linealmente polarizada en la dirección z o x se puede expresar como una función de la cantidad Z o X , respectivamente en la siguiente manera:

$$w_j(\lambda) = \frac{\pi(E_0^L)^2 \lambda P(\lambda)}{2\hbar} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi J f(\theta, \varphi, \psi) \sin \theta d\theta d\varphi d\psi$$

(18)

donde $j = z, x$ y $J = Z, X$.

Los coeficientes de extinción para cada dirección de orientación j se pueden expresar como:

$$\varepsilon_j(\lambda) = \frac{8\pi N_A}{2303cn(E_0^L)^2} w_j(\lambda) \quad (19)$$

Cuando las soluciones obedecen la ley de Lambert-Beer es posible expresar el DLER, $\left(\frac{\Delta A}{A}\right)$, como la razón

entre la diferencia de los coeficientes de extinción para dos orientaciones perpendiculares, ε_z y ε_x , y el coeficiente de extinción, ε , para cromóforos orientados al azar, de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\varepsilon_z - \varepsilon_x}{\varepsilon} \quad (20)$$

Con lo cual obtenemos la siguiente expresión para calcular el DLER:

$$\left(\frac{\Delta A}{A}\right) = \left(\frac{3}{\mu^2}\right) \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (Z - X) f(\theta, \varphi, \psi) \sin \theta d\theta d\varphi d\psi \quad (21)$$

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparamos una solución acuosa de ADN Sigma Type I "Highly Polymerized" de timo de ternera en NaCl 1 mol m^{-3} , sonicada hasta obtener fragmentos. El efector osmótico empleado fue Sorbitol ICN Biomedicals Inc. MW: 182,17. Para preparar el complejo, se realizó la mezcla, en la adecuada proporción, de soluciones acuosas stock de ADN, sorbitol y NaCl.

La concentración de ADN utilizada fue de 5 mg/dl , mientras que las concentraciones de sorbitol fueron de 0 mol m^{-3} , 50 mol m^{-3} , 75 mol m^{-3} y 100 mol m^{-3} .

Las mediciones de DLE fueron realizadas a la longitud de onda $\lambda = 260 \text{ nm}$ a la cual se produce el máximo de absorción por parte de los grupos cromóforos presentes en el ADN.

IV. RESULTADOS

Mediciones de Dicroísmo Lineal Eléctrico Reducido

Nuestro equipo experimental⁽¹⁶⁾ es similar al descrito por Fredericq and Houssier⁽¹⁷⁾. Un haz de luz monocromático colimado, linealmente polarizado pasa a través de la celda de medida (la celda de Kerr), emergiendo como un haz de luz anisotrópico. La solución estudiada se ubica en la celda de Kerr que contiene dos electrodos por medio de los cuales se aplica, a la muestra, una diferencia de potencial eléctrico en forma de pulso rectangular.

El pulso eléctrico se registra en un canal de un osciloscopio, mientras que la señal luminosa y el cambio en la intensidad de la luz, debida a la anisotropía provocada por la aplicación del campo eléctrico, detectadas por un fotomultiplicador se registran en el otro canal del osciloscopio. La figura 2 muestra un

ejemplo de las señales detectadas para una solución de ADN-sorbitol.

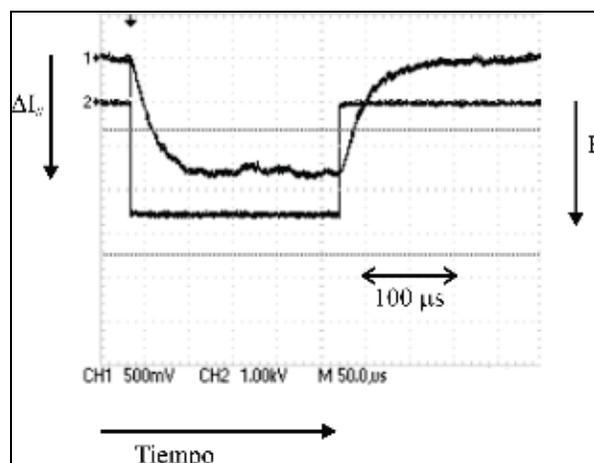


Figura 2. Señal digitalizada de dicroísmo lineal eléctrico para una solución de ADNsonicado-sorbitol a 260 nm . Intensidad del campo aplicado $E = 16,8 \times 10^5 \text{ V/m}$. Concentración de ADN 5 mg/dl . Concentración de sorbitol: 50 mol m^{-3} .

Si la dirección de polarización se ubica paralela al campo eléctrico orientador, a partir de los datos experimentales calculamos el DLER de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta A}{A} = -\frac{1.5}{A} \log_{10} \left(\frac{\Delta I_{//}}{I} + 1 \right) \quad (22)$$

donde I es la intensidad de luz transmitida por la solución en ausencia del campo eléctrico y $\Delta I_{//} = I_{//} - I$ es el cambio en la intensidad de la luz que atraviesa la solución, resultante de la aplicación del pulso eléctrico.

La absorbancia de la solución se calcula de la siguiente manera:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (23)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz transmitida por el solvente isotrópico.

Resultados experimentales y curvas de ajuste teóricas del Dicroísmo Lineal Eléctrico Reducido

La Figura 3 muestra los resultados experimentales de DLER en función del campo eléctrico orientador, para soluciones de ADN con diferentes concentraciones de sorbitol, y las correspondientes curvas teóricas calculadas con la teoría desarrollada. La muestra sin sorbitol es la más dicroica. A medida que se incrementa la concentración de sorbitol observamos que el dicroísmo disminuye.

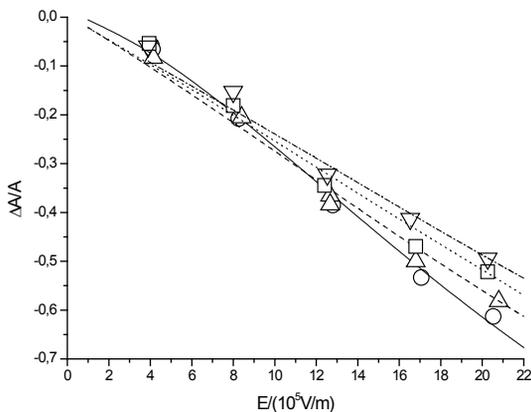


Figura 3. Dependencia con el campo eléctrico del DLER. Se muestran datos experimentales y teóricos. □ solución de ADN sin sorbitol; (—) curva teórica caso ADN sin sorbitol; □ solución de ADN con sorbitol 50 mol m⁻³; (----) curva teórica caso sorbitol 50 mol m⁻³; □ solución de ADN con sorbitol 75 mol m⁻³; (—) curva teórica caso sorbitol 75 mol m⁻³; □ solución de ADN con sorbitol 100 mol m⁻³; (—) curva teórica caso sorbitol 100 mol m⁻³. Las medidas de DLER fueron realizadas a 260 nm, concentración de ADN 5mg/dl.

Los parámetros de ajuste son el coeficiente de polarizabilidad a campo nulo y el campo eléctrico de transición. Ajustando las curvas teóricas a las experimentales, ver figura 3, se obtuvieron los valores de los parámetros que se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Concentración de sorbitol [mol m ⁻³]	κ ₀ x 10 ⁻⁸ [m]	E ₀ x 10 ⁵ [V/m]
0	1,59	2,500
50	15,90	0,200
75	58,00	0,050
100	545,00	0,005

En nuestros cálculos utilizamos un ángulo χ de 150° entre los brazos de las varillas. Este valor resulta de considerar un ángulo promedio para distintas conformaciones en un modelo de varillas quebradas flexibles en la bisagra⁽⁷⁾.

Suponemos que la distancia a, en la cual se pueden mover transversalmente los contraiones cuando se aplica un campo eléctrico transversal a la varilla, es del orden de la inversa de la constante de Debye-Hückel. Para nuestras experiencias de electroóptica, la fuerza iónica de las soluciones empleadas es de 1 mol/m³. En estas condiciones estimamos que la distancia a es alrededor de 10 nm⁽⁷⁾.

A través de medidas de decaimiento del DLER, obtenidas al quitar el campo eléctrico orientador, se construye una gráfica de DLER en función del tiempo. Esta gráfica se puede ajustar aproximadamente con la siguiente función:

$$\left(\frac{\Delta A}{A}\right)(t) = \left(\frac{\Delta A}{A}\right)_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

(24)

donde

$\left(\frac{\Delta A}{A}\right)(t)$ es el DLER al tiempo t

$\left(\frac{\Delta A}{A}\right)_0$ es el DLER para t = 0

τ es el tiempo de relajación promedio. Con la ecuación (24) se determina el tiempo de relajación promedio de las moléculas en solución. Houssier⁽¹⁸⁾ construye gráficas de la dependencia del peso molecular con el tiempo de relajación. Para ello utiliza datos experimentales de otros autores que midieron el tiempo de relajación para muestras monodispersas (fragmentos de ADN obtenidos por enzimas de restricción). De estas gráficas se determina el peso molecular promedio de los fragmentos de ADN. Tomando un peso molecular por

$$2000 \frac{\text{dalton}}{\text{nm}}$$

unidad de longitud de $\frac{2000 \text{ dalton}}{\text{nm}}$, obtenemos la longitud promedio de los fragmentos. Para nuestras muestras de ADN sonificado obtuvimos una longitud promedio L = 65 nm de cada brazo de la VQR.

En la Figura 4 representamos la dependencia funcional de la componente z del momento dipolar eléctrico inducido con el campo eléctrico orientador, dada por la ecuación (13) para una cierta orientación de la VQR en el campo eléctrico. Aquí utilizamos los valores de coeficiente de polarizabilidad a campo nulo y de campo eléctrico de transición dados en la Tabla 1.

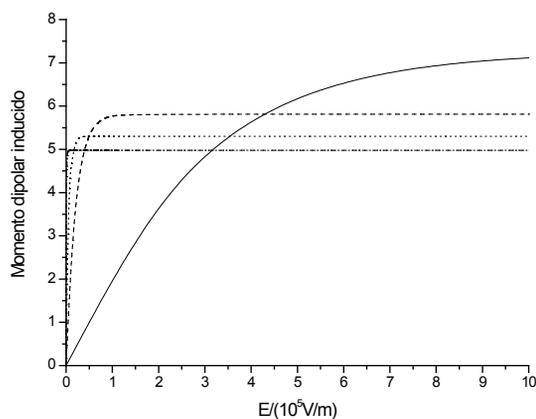


Figura 4. Momento dipolar eléctrico inducido m_z en función del campo eléctrico orientador. (—) curva teórica caso ADN sin sorbitol; (---) curva teórica caso sorbitol 50 mol m⁻³; (—) curva teórica caso sorbitol 75 mol m⁻³; (----) curva teórica caso sorbitol 100 mol m⁻³.

Los valores de los momentos dipolares de saturación para las distintas concentraciones de sorbitol que obtenemos de la ecuación (13) utilizando los correspondientes parámetros de ajuste se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Concentración de sorbitol [mol m ⁻³]	Momento dipolar de saturación x 10 ⁻²⁷ [C m]
0	7,26
50	5,81
75	5,30
100	4,98

El aumento de la pendiente, de la curva del momento dipolar inducido en función del campo eléctrico aplicado (ver Figura 4), a medida que se agrega sorbitol y la disminución del campo eléctrico de transición, tiene como consecuencia que el momento dipolar inducido de saturación sea cada vez menor.

V. DISCUSIÓN

El importante decaimiento del momento dipolar inducido encontrado puede ser interpretado a partir del hecho que la presencia de sorbitol en la solución modifica la capa de condensación de contraiones del ADN de dos maneras: a) el sorbitol rompe la estructura del agua de la macromolécula, modificando el entorno de los iones sodio; b) el sorbitol perturba la capa de hidratación de los iones sodio, originando una disminución del apantallamiento electrostático alrededor de los grupos fosfato.⁽²⁾⁽³⁾

Por ello la intensidad de la interacción electrostática entre los iones sodio y los grupos fosfato aumenta. En consecuencia se reduce la movilidad de una parte de los contraiones condensados y la posibilidad de fluctuaciones en la distribución de esos contraiones. Esto tiene como consecuencia que habrá una carga eléctrica disponible, polarizable, menor dando como resultado un momento dipolar inducido de saturación menor.

Por otro lado las teorías de polarización proponen que la polarizabilidad depende de dos términos. Uno que establece que la reducción de la fracción de contraiones condensados hace que disminuya la polarizabilidad a campo nulo. El otro término establece que cuando disminuye la densidad de la fase de contraiones condensados, también lo hace la interacción de los contraiones y esto resulta en un aumento de la polarizabilidad a campo cero. Además, predice que este segundo término es mucho más importante que el primero en la determinación del comportamiento de la polarizabilidad a campo cero⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾.

Como resultado se obtendría un aumento del coeficiente de polarizabilidad a campo cero debido a la disminución de la interacción entre los contraiones polarizables. En consecuencia se incrementa la polarizabilidad a campo nulo, que es una medida de la variación del momento dipolar inducido en función del campo eléctrico aplicado cuando éste tiende a cero.

Además, la reducción de los contraiones móviles hace que el campo eléctrico aplicado sea más efectivo

para polarizar la molécula, lo cual se traduce en una disminución del valor del campo eléctrico de transición que conduce a la saturación del momento dipolar inducido.

En consecuencia, a medida que se aumenta la concentración de sorbitol, se observa una disminución del campo eléctrico de transición que da como resultado un momento dipolar inducido de saturación menor, produciendo un menor grado de orientación de las macromoléculas en solución, lo cual se refleja en una disminución del dichroísmo lineal eléctrico reducido del complejo.

Referencias

- 1 – Colson P., Bailly C., Houssier C. *Biophysical Chemistry*, **58**, 125-140 (1996).
- 2 – Flock S., Labarbe R., Houssier C. *Biophysical Journal*, **71**, 1519-1529 (1996).
- 3 – Stanley C., Rau D. *Biophysical Journal*, **91**, 912-920 (2006).
- 4 – Corral G.M., Bertolotto J.A. *Anales de la Asociación Física Argentina*, **16**, 185-188 (2004).
- 5 – Corral G.M., Bertolotto J.A. *Anales de la Asociación Física Argentina*, **18**, 262-265 (2006).
- 6 – Schellman J.A. *Chemical Reviews*, **75**, 323-331 (1975).
- 7 – Bertolotto J.A., Campo M.G., Roston G.B. and Ascheri M.E. *Colloids and Surfaces A*, **203**, 167-183 (2002).
- 8 – Antosiewicz J., Porschke D., *J. Phys. Chem. B*, **101**, 4478-4484 (1997).
- 9 – Rau D.C., Charney E. *Macromolecules*, **16**, 1653-1661 (1983).
- 10 – Stellwagen N.A. *Biopolymers*, **20**, 99-434 (1981).
- 11 – Schlagberger X., Netz R.R. *Europhys. Lett.*, **83**, 36003 p1-p6 (2008).
- 12 – Grycuk T., Antosiewicz J., Porschke D. *J. Phys. Chem.*, **98**, 10881-10887 (1994).
- 13 – Goldstein H., *Classical Mechanics*. Addison-Wesley, San Francisco (2002).
- 14 – Böttcher C.J.F., *Theory of Electric Polarization Vol. 1* 2^o ed., Elsevier, Amsterdam (1973).
- 15 – Bertolotto J.A., Corral G.M., Fariás de la Torre E.M., Roston G.B., *J. Phys: Condens. Matter*, **22**, 494101 (9pp), (2010), doi: 10.1088/0953-8984/22/49/494101.
- 16 – Bertolotto J.A., Willging P., Pugnali L., Bustos H.D., *Anales de la Asociación Física Argentina*, **5**, 486-488 (1993).
- 17 – Fredericq E., Houssier C., *Electric dichroism and electric birefringence*, Clarendon Press, Oxford (1973).
- 18 – Houssier C., en *Molecular Electro-Optics, Electro-optics Properties of Macromolecules and Colloids in Solutions* (ed. por S. Krause) Plenum Press, New York (1981).
- 19 – Oosawa F., *Polyelectrolytes*. Ed. Marcel Dekker, New York (1971).
- 20 – Hornick C., Weill G., *Biopolymers*, **10**, 2345-2358 (1971).
- 21 – Manning G. *Biophys. Chem.*, **72**, 65-70 (1978).