

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA β -ALANINA SOBRE EL ADN EN SOLUCIÓN ACUOSA MEDIANTE TÉCNICAS ELECTRO-ÓPTICAS

STUDY OF β -ALANINA EFFECT ON DNA AQUEOUS SOLUTION THROUGH ELECTRO-OPTICAL TECHNIQUES

J. P. Umazano¹, J. A. Bertolotto^{2*}, M. V. Ferreyra³

¹Facultad de Ciencias Exactas – Universidad Nacional de La Plata
Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) - Universidad Nacional de La Pampa
Uruguay 151 - (6300) - Santa Rosa – La Pampa - Argentina

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) - Universidad Nacional de La Pampa
Uruguay 151 - (6300) - Santa Rosa – La Pampa – Argentina

³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) - Universidad Nacional de La Pampa
Uruguay 151 - (6300) - Santa Rosa – La Pampa - Argentina
e-mail: jbertolotto@exactas.unlpam.edu.ar

Recibido 28/02/11; aprobado 01/07/11

En este trabajo se realizan medidas de dicroísmo lineal eléctrico reducido (DLER) para analizar los cambios estructurales en el ADN provocados por la β -alanina. Se utilizan fragmentos de ADN obtenidos mediante el sonicado de soluciones acuosas de ADN nativo. Para caracterizar la distribución de tamaños de los fragmentos de ADN se realiza una electroforesis en gel de la solución. Los resultados de DLER se analizan empleando un marco teórico desarrollado en trabajos previos. El análisis teórico describe a la solución como una mezcla de arcos rígidos de diferentes longitudes, de acuerdo a los resultados provenientes de la electroforesis. La orientación de los fragmentos de ADN al aplicar el campo eléctrico se caracteriza con la función de distribución orientacional que resulta de resolver numéricamente la ecuación de Fokker-Planck del sistema. Realizando el ajuste teórico de las curvas experimentales de DLER se obtiene la polarizabilidad eléctrica de las moléculas y el factor de ionización de las mismas. Se discute el efecto de la β -alanina en los parámetros conformacionales de los fragmentos de ADN.

Palabras Claves: dicroísmo eléctrico, ADN, β -alanina

In the present work we measure reduced electric linear dichroism (RELD) to analyze structural changes in DNA caused by β -alanine. We use DNA fragments obtained through sonication of native DNA aqueous solutions. To characterize the distribution of sizes of DNA fragments we make an electrophoresis in gel of the solution. The results of the RELD are analyzed using a theoretical method developed in previous works. The theoretical analysis describes the solution as a mixture of rigid arcs of different lengths, according to the results obtained by electrophoresis. The DNA fragments orientation, when we apply the electric field, is characterized through the orientational distribution function that results from numerically solving the Fokker-Planck equation of the system. Making the theoretical adjustment of the RELD experimental curves, we obtain the molecules electric polarizability and their ionization factor. We discuss the effect of β -alanine in the conformational parameters of DNA fragments.

Key Word: electric dichroism, DNA, β -alanine

I. INTRODUCCIÓN

Al aplicar un campo eléctrico sobre una solución de macromoléculas ésta se convierte en dicroica. El dicroísmo lineal eléctrico se define como la diferencia entre las absorbancias que presenta la solución para luz incidente linealmente polarizada según las direcciones paralela y perpendicular al campo eléctrico aplicado. Mediante un dispositivo de medición apropiado es posible medir el dicroísmo lineal eléctrico y determinar sus variaciones con la intensidad del campo eléctrico. Si se utiliza el marco teórico adecuado es posible ajustar los resultados experimentales y utilizar este

procedimiento como técnica para determinar propiedades físicas de las moléculas en solución. Por supuesto, la complejidad del análisis teórico dependerá de las características físicas de las moléculas en solución⁽¹⁻⁴⁾.

En el caso de soluciones de ADN es posible disponer de muestras monodispersas utilizando fragmentos de restricción que se obtienen cortando secuencias específicas de la cadena de ADN mediante enzimas de restricción. Lamentablemente, es realmente difícil y costoso obtener mediante esta técnica cantidades de ADN suficientes como para realizar medidas sistemáticas de dicroísmo eléctrico. Ante esto,

* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

una posibilidad es utilizar soluciones de ADN soncado. Las muestras así obtenidas no son monodispersas y el análisis teórico requiere considerar la distribución de tamaños que caracteriza la muestra disponible.

En primera instancia, en el presente trabajo se aplican desarrollos teóricos realizados en trabajos anteriores para ajustar datos experimentales de dicroísmo eléctrico de soluciones de ADN soncado. A fin incluir en la descripción teórica la polidispersión de las muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa para conocer la distribución de tamaños de los fragmentos de ADN soncado.

El efecto del compuesto zwitteriónico β -alanina en solución acuosa con ADN ha sido estudiado mediante la aplicación de diversas técnicas, entre las cuales se pueden citar $^{23}\text{NaNMR}^{(5)}$ y precipitación de ADN por espermina⁽⁶⁾.

En un trabajo previo⁽⁷⁾ se realizó el estudio de la polarizabilidad eléctrica del ADN en presencia de β -alanina y ácido aminobutírico a distintas concentraciones, utilizando la técnica de birrefringencia eléctrica. En este trabajo proponemos el empleo de mediciones de dicroísmo lineal eléctrico reducido para analizar los cambios estructurales en el ADN provocados por la β -alanina.

II. TEORÍA

A. Modelo molecular: arco rígido

Los fragmentos de ADN se modelan mediante un arco rígido con longitud de arco S_0 , radio de curvatura R y ángulo de bending $2\gamma_0$ (Fig. 1). El arco rígido se coloca en el plano $X'Z'$ del sistema de coordenadas del cuerpo, $O'X'Y'Z'$, cuyo origen O' coincide con el centro de masa del arco.

Las propiedades eléctricas del arco se caracterizan por: su carga eléctrica efectiva q igual a $N_{pb}en$, donde N_{pb} es el número de pares de bases en el arco, e la carga eléctrica del electrón y n el factor de ionización, y por su tensor de polarizabilidad eléctrica $[\alpha^E]$. En este trabajo empleamos un modelo de polarizabilidad eléctrica para moléculas tipo arco rígido desarrollado por Bertolotto et al.⁽⁸⁾, según el cual los elementos del tensor polarizabilidad eléctrica vienen dados por

$$\alpha_{x'x'}^E = 2KR^2 \left[1 - \cos\left(\frac{S_0}{2R}\right) \right]^2 + \frac{1}{2}KaR \left[\text{sen}\left(\frac{S_0}{2R}\right) + \frac{S_0}{R} \right] \quad (1)$$

$$\alpha_{y'y'}^E = KS_0a \quad (2)$$

$$\alpha_{z'z'}^E = 4KR^2 \text{sen}^2\left(\frac{S_0}{2R}\right) + \frac{1}{2}KaR \left[\frac{S_0}{R} - \text{sen}\left(\frac{S_0}{R}\right) \right] \quad (3)$$

donde K es una constante de polarizabilidad eléctrica y a es la longitud a través de la cual los contraiones

ligados pueden desplazarse en dirección radial en cualquier punto del arco.

Las propiedades hidrodinámicas del modelo de arco rígido se caracterizan por su tensor de difusión rotacional $[R]$, cuyos elementos principales son $R_{x'x'}$, $R_{y'y'}$, $R_{z'z'}$, y por su tensor de difusión de acoplamiento rotación-traslación $[P]$, cuyos elementos no nulos son $P_{y'z'}$ y $P_{z'y'}$ ^(9,10).

Las propiedades ópticas se describen mediante el momento dipolar de transición de cada grupo cromóforo en la molécula.

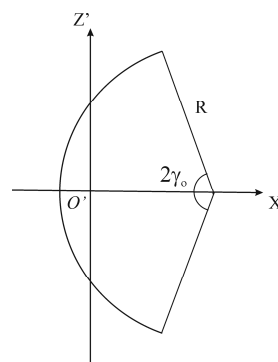


Figura 1. Modelo de arco rígido.

B. Dicroísmo lineal eléctrico reducido

Consideremos una solución de moléculas sobre la que se aplica un campo eléctrico externo que supondremos estático y uniforme. El dicroísmo lineal eléctrico reducido se define como

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A} \quad (4)$$

donde $A_{//}$ y A_{\perp} son las absorbancias de la solución para luz incidente linealmente polarizada según las direcciones paralela y perpendicular al campo eléctrico aplicado y A es la absorbancia de la solución cuando las moléculas están orientadas aleatoriamente.

Las absorbancias A , $A_{//}$ y A_{\perp} dependen de la capacidad de la luz para inducir transiciones electrónicas en las moléculas de la solución. Por lo tanto, las mismas dependen de las propiedades ópticas de las moléculas, a saber, del momento dipolar eléctrico de transición de cada uno de sus grupos cromóforos y de cómo éstos se encuentran distribuidos a través de las mismas.

Las absorbancias $A_{//}$ y A_{\perp} dependen no sólo de las propiedades ópticas, sino también de la orientación que en promedio adquieren las moléculas cuando se aplica sobre la solución el campo eléctrico externo. Para caracterizar la orientación de una molécula utilizamos los ángulos de Euler ϕ , θ , ψ , que determinan la orientación del sistema de coordenadas del cuerpo con

respecto al sistema de coordenadas del laboratorio. El cálculo de las absorbancias, y por lo tanto del DLER, requiere considerar todas las orientaciones posibles de las moléculas. Para ello se incluye la función de distribución orientacional f que determina la densidad de probabilidad de encontrar una partícula con una orientación entre ϕ , θ , ψ y $\phi + d\phi$, $\theta + d\theta$, $\psi + d\psi$. En realidad, en virtud de la simetría cilíndrica introducida por el campo eléctrico, la función de distribución orientacional resulta independiente del ángulo ϕ .

El efecto del acoplamiento hidrodinámico en las propiedades electro-ópticas de fragmentos arqueados de ADN fue estudiado empleando simulación dinámica Browniana, por Porschke y colaboradores⁽¹¹⁻¹³⁾. En este trabajo usamos un enfoque diferente consistente en el planteo y resolución de la ecuación de Fokker-Planck del sistema^(8,14-17).

Bertolotto et al.⁽⁸⁾ deducen una expresión para el DLER de una solución diluida de fragmentos de ADN descritos con el modelo de arco rígido. En este trabajo emplearemos el resultado obtenido por estos autores, según el cual el DLER viene dado por

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{3\pi}{16\gamma_0} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi [(-\gamma_0 - 3A_0)(1 + 3\cos 2\theta) - 6(-\gamma_0 + A_0) \cos 2\psi \sin^2 \theta] f(\theta, \psi) \sin \theta d\theta d\psi \quad (5)$$

donde $A_0 = \cos \gamma_0 \sin \gamma_0$.

La ec.(5) supone que cada monómero en la cadena de ADN constituye un grupo cromóforo cuyo momento dipolar de transición está aleatoriamente orientado en el plano de sus bases. Además, esta ecuación supone que la interacción entre los diferentes grupos cromóforos de una molécula es suficientemente débil como para despreciarla.

El cálculo del DLER mediante la ec.(5) requiere conocer la función de distribución orientacional $f(\theta, \psi)$ de las moléculas al aplicar el campo eléctrico. La ecuación diferencial que determina la función de distribución orientacional para moléculas tipo arcos rígidos, eléctricamente cargados y polarizables, ha sido deducida anteriormente por Bertolotto⁽¹⁴⁾ como una aplicación de la ecuación de Fokker-Planck al problema en cuestión. Él encuentra que la función de distribución orientacional satisface la siguiente ecuación diferencial

$$\left(Q_{\theta\theta} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} + Q_{\psi\psi} \frac{\partial^2}{\partial \psi^2} + Q_{\psi\theta} \frac{\partial^2}{\partial \psi \partial \theta} + Q_\theta \frac{\partial}{\partial \theta} + Q_\psi \frac{\partial}{\partial \psi} + Q_{00} \right) f(\theta, \psi) = 0 \quad (6)$$

donde los coeficientes que acompañan a las derivadas son funciones de los parámetros eléctricos e hidrodinámicos de las moléculas y de los ángulos de Euler.

La resolución de la ec.(6) presenta cierta dificultad matemática y en el presente trabajo se resuelve numéricamente aplicando el método de diferencias finitas, tal como se describe en un trabajo anterior⁽¹⁵⁾.

III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A. Preparación de las muestras

Se utilizó ADN de timo de ternera altamente polimerizado marga SIGMA, tipo I, cat. D1501. Se sonicó una solución acuosa de 100 mg/dl de ADN en 1mM NaCl, realizando 30 ciclos de 60 segundos de sonicación seguidos de 30 segundos de reposo, conservando la muestra a 5°C. En la sección IV.A se muestra que la solución sonicada contiene fragmentos de ADN de longitudes comprendidas entre 500 y 3000 Å. Para medir el dicroísmo eléctrico, la solución se diluyó hasta alcanzar una concentración de ADN de 5 mg/dl. A ésta se le agregó β -alanina (Sigma A-7752) en estado sólido para obtener cinco muestras con distinta concentración de este compuesto: 0 M, 0.4 M, 0.8 M, 1.2 M y 1.6 M.

B. Equipo experimental para medir el DLER

Las mediciones de dicroísmo eléctrico se realizaron con un equipo diseñado en nuestro laboratorio⁽¹⁹⁾, constituido por una fuente de luz de tungsteno, un monocromador y un polarizador de Glan-Taylor (P) de 1 cm² de abertura que transmite en el ultravioleta-visible, un generador de pulsos rectangulares de alta potencia Velonex Model 360 de hasta 3000 V y 10 A con un ancho de pulso entre 10 ns y 10 ms, una celda de Kerr de 0.15 cm de distancia entre electrodos planos y 1 cm de camino óptico, un fotomultiplicador 1P28 y un osciloscopio marca Tektronix TDS 1012 con dos canales, de 100MHz, conectado mediante una interfase a una computadora.

C. Determinación experimental del DLER en función del campo eléctrico

En la experiencia, el DLER se calcula mediante la fórmula⁽¹⁾

$$\frac{\Delta A}{A} = -\frac{1.5}{A} \log \left(1 + \frac{\Delta I_{//}}{I} \right) \quad (7)$$

donde I es la intensidad de luz transmitida y A la absorbancia de la solución en ausencia del campo eléctrico, $\Delta I_{//} = I_{//} - I$ el cambio de intensidad de la luz a través de la solución e $I_{//}$ la intensidad de luz transmitida por la solución, ambas en presencia de campo eléctrico aplicado y para luz incidente polarizada paralelamente a éste. Las cantidades $\Delta I_{//}$ e I pueden registrarse en el osciloscopio ya que son proporcionales a las señales de potencial en el oscilograma. La absorbancia A se mide con un espectrofotómetro convencional.

IV. RESULTADOS

A. Caracterización de las muestras de ADN sonicado

A fin de poder caracterizar el tamaño de los fragmentos de ADN en la muestra sonicada, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa de la solución. Para la calibración de los pesos moleculares se usó un

marcador de peso molecular ladder de 100 pb. La Fig. 2 muestra el gráfico de densidad óptica en función del peso molecular obtenido en la experiencia. Los datos experimentales se ajustaron mediante la superposición de cinco funciones gaussianas, cuyas características se muestran en la Tabla 1.

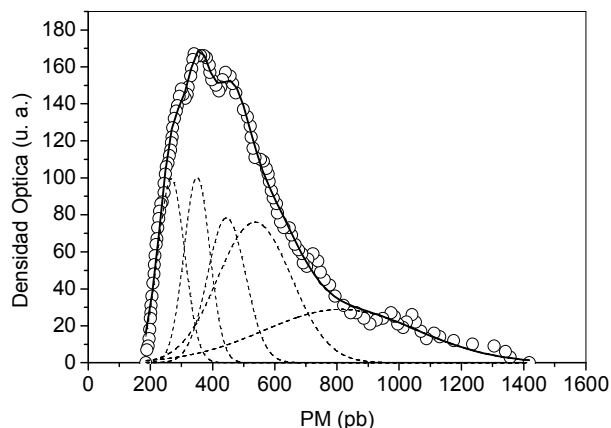


Figura 2. Distribución de tamaños de las cadenas de ADN en la solución sonicada, obtenida mediante electroforesis en gel de agarosa. Los círculos representan los datos experimentales, las líneas discontinuas la descomposición en funciones gaussianas y la línea continua la superposición de éstas.

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DE LAS FUNCIONES GAUSSIANAS UTILIZADAS PARA EL AJUSTE DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE FRAGMENTOS DE ADN SONICADO.

Gaussiana	Media (pb)	Desviación Estándar (pb)	Valor Máximo (u. a.)	Media (Å)
1	267.32	41.54	103.73	908.88
2	349.95	39.81	104.74	1189.83
3	445.05	59.80	80.01	1513.17
4	535.87	117.69	76.40	1821.96
5	811.84	247.22	28.87	2760.26

B. DLER de la solución de ADN

Se midió el DLER para la solución de ADN sin agregado de β -alanina. La Fig. 3 muestra los datos experimentales obtenidos en función de la intensidad de campo eléctrico aplicado.

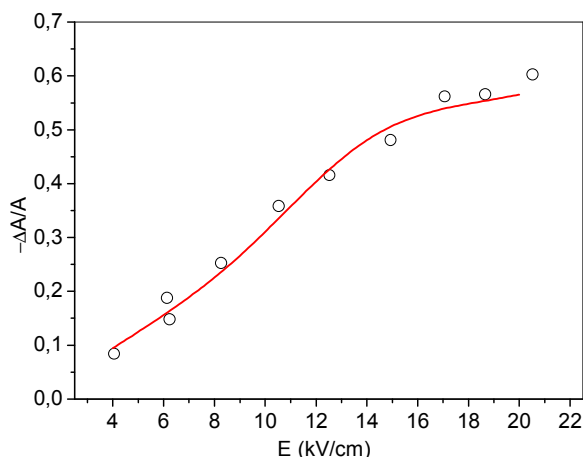


Figura 3. DLER de una solución acuosa de ADN de 5 mg/dl en 1mM NaCl.

Para hacer un ajuste teórico de los datos experimentales, se consideró que la muestra se compone por cinco fracciones de cadenas de ADN de diferente longitud, de acuerdo con los resultados de la electroforesis mostrados en la Tabla 1. A fin de tener en cuenta el peso de cada fracción, el DLER de la solución se expresa como el promedio ponderado del DLER correspondiente a cada longitud de cadena

$$\frac{\Delta A}{A} = \sum_i n_i \left(\frac{\Delta A}{A} \right)_i \quad (8)$$

donde el índice i representa las distintas fracciones, y n_i los correspondientes pesos estadísticos.

Cada fracción fue descrita empleando el modelo de arco rígido mencionado en la sección II.A. El ángulo de bending para cada fracción se estimó de manera que la

distancia extremo a extremo cuadrática media $\langle d^2 \rangle$ satisfaga la siguiente relación, obtenida por Porod-Kratky⁽²⁰⁾

$$\langle d^2 \rangle = 2pS_0 \left(1 - \frac{p}{S_0} + \frac{p}{S_0} e^{-L/p} \right) \quad (9)$$

donde p es la longitud de persistencia del ADN, y que para nuestro estudio se consideró igual a 850 Å, del orden del valor determinado para fuerza iónica baja⁽²¹⁾, 1 mM o menor. El ángulo de bending se puede expresar en función de las características geométricas del modelo de la siguiente manera

$$2\gamma_0 = \frac{S_0}{d} \sqrt{2(1 - \cos 2\gamma_0)} \quad (10)$$

donde $d = \sqrt{\langle d^2 \rangle}$ es la distancia extremo a extremo.

Para obtener los parámetros hidrodinámicos de los arcos se utilizó el software Hydro++⁽²²⁾, a partir del cual se obtuvieron los elementos del tensor de difusión rotacional y del tensor de difusión de acoplamiento traslación-rotación.

El ajuste teórico de los datos experimentales se llevó a cabo resolviendo numéricamente la ec.(5), y teniendo como parámetros variables la constante de polarizabilidad eléctrica K y el factor de ionización de las moléculas de ADN n . En este ajuste se encontraron estimaciones para dichos parámetros, siendo los resultados del ajuste $2.7 \times 10^{-5} \text{ cm}$ para la constante de polarizabilidad eléctrica y 0.14 para el factor de ionización. En la Fig. 3 el ajuste teórico está representado por la línea continua.

C. DLER del complejo ADN - β -alanina

Se midió el DLER para las muestras de ADN con distintas concentraciones de β -alanina. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Al observar el conjunto de datos es posible apreciar que, dentro del error experimental,

no existe un efecto neto sobre el DLER de la solución al agregar β -alanina.

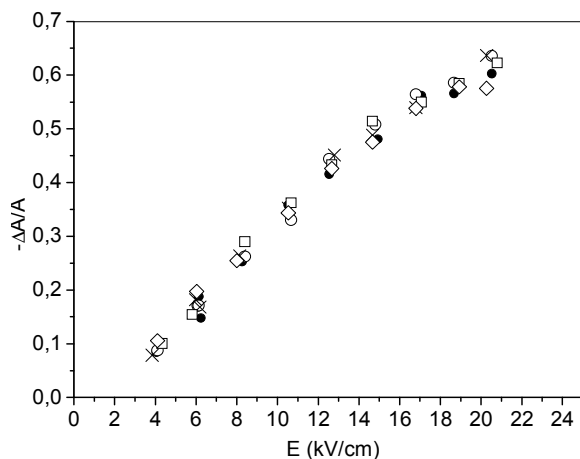


Figura 4. Datos experimentales obtenidos de la medición del DLER para soluciones de ADN sonicadas, con distintas concentraciones de β -alanina, en función del campo eléctrico aplicado. Los símbolos se refieren a las distintas concentraciones de β -alanina: ● 0 M, ○ 0.4 M, × 0.8 M, □ 1.2 M, ◇ 1.6 M.

V. DISCUSIÓN

Como es de esperar, los resultados obtenidos mediante experiencias de electroforesis en gel muestran que las soluciones de ADN sonicado presentan un alto grado de polidispersión.

Se puede incluir en el análisis teórico del DLER la dispersión de tamaños considerando que la solución es una mezcla de fragmentos de diferentes longitudes de cadena, de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos con técnicas de electroforesis.

Empleando el modelo de arco rígido para describir a los diferentes fragmentos de ADN y aplicando un marco teórico previamente desarrollado, es posible ajustar relativamente bien curvas de DLER de soluciones de ADN sonicado en función del campo eléctrico aplicado. No obstante, se observan algunas discrepancias entre los valores experimentales y los resultados teóricos que pueden ser atribuidas a que el marco teórico aplicado no incluye algunos aspectos, como por ejemplo la flexibilidad de las moléculas, que con seguridad tienen su efecto sobre las predicciones teóricas.

Es realmente interesante que el agregado de β -alanina a la solución de ADN sonicado no provoque un efecto significativo sobre el DLER en todo el rango de intensidades de campo eléctrico utilizado en las experiencias. Es sabido que al incorporar β -alanina la constante dieléctrica de la solución incrementa según la relación⁽⁵⁾

$$\varepsilon = 80 + 34.6C_{\beta} \quad (11)$$

donde C_{β} es la concentración molar de β -alanina en la solución.

Según las teorías de Manning y Osawa^(23,24), esta variación de la constante dieléctrica de la solución al agregar β -alanina debería aumentar un factor 1.5 el valor de la polarizabilidad eléctrica del polielectrolito al llevar

la concentración de β -alanina de 0 a 1.6 M. Por lo tanto, sería de esperar que las curvas de DLER se separen, alcanzando valores mayores, a medida que crece la concentración de β -alanina.

El efecto de la β -alanina sobre las propiedades físicas del polielectrolito es realmente más complejo que la sola variación de la polarizabilidad eléctrica. Manning, en su teoría de condensación de contraiones⁽²⁵⁾ también predice la disminución de la fracción de contraiones condensados al incorporar β -alanina, ya que se incrementa la constante dieléctrica. Esto es, el agregado de β -alanina produce un aumento de la carga neta del polielectrolito. La componente del DLER originada en la orientación de las moléculas producto de la migración electroforética combinada con el acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación resulta modificada si aumenta la carga eléctrica neta. En este caso, contrariamente a lo que ocurre con el incremento de la polarizabilidad, las curvas de DLER se separan, alcanzando valores menores, a medida que crece la concentración de β -alanina.

El efecto de la β -alanina, por un lado hace crecer los valores de DLER, debido al aumento de la polarizabilidad, mientras que por otro produce un aumento de la carga, que afecta al DLER de manera contraria.

Además se midió el tiempo de relajación τ del DLER al remover el campo eléctrico aplicado y se encontró que el mismo disminuye a medida que aumenta la concentración de β -alanina (ver Fig. 5). Esto significa que tiene lugar una disminución de la distancia extremo a extremo de la cadena polielectrolítica debido a la presencia del compuesto zwitteriónico. Este efecto también hace disminuir los valores del DLER.

En virtud de expuesto, la β -alanina altera de diversas maneras las propiedades físicas de las moléculas en la solución de ADN sonicado. El hecho de que no varíen las curvas de DLER versus campo eléctrico con el agregado de β -alanina hace pensar que los efectos individuales son colectivamente compensados. Actividades futuras deberían dirigirse a la demostración cuantitativa de esta aseveración.

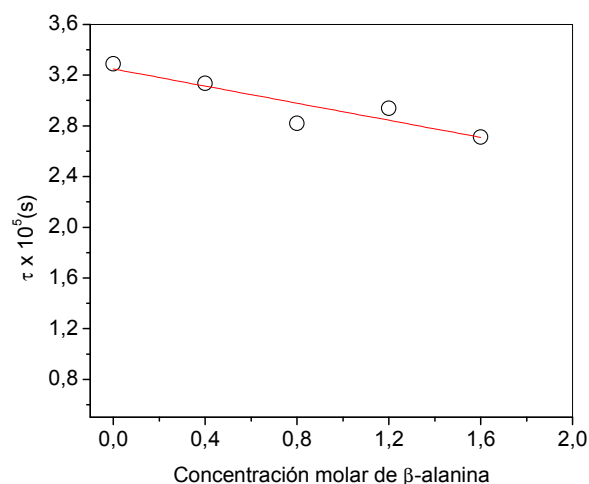


Figura 5. Tiempo de relajación del DLER para soluciones de ADN sonicadas, con distintas concentraciones de β -alanina.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Lic. Laura Mazzaferro por las contribuciones a la parte experimental de este trabajo.

25- Manning, G. Q. Rev. Biophys., **2**, 179-246 (1978).

Referencias

- 1- Fredericq E. and C. Houssier in "Electric dichroism and electric birefringence", Clarendon Press, Oxford (1973).
- 2- O'Konski, C. T. in "Molecular electro-optics", Dekker, New York (1976).
- 3- Stoylov, S. P. in "Colloid electro-optics: theory, techniques, applications", Academic Press, London (1991).
- 4- Porschke, D. and J. M. Antosiewicz. Quantitative molecular electro-optics: Macromolecular structures and their dynamics in solution in "Molecular and colloidal electro-optics"; Stoylov, S. P. and M. V. Stoimenova. Eds.; CRC: Boca Raton, FL, 55 (2007).
- 5- Flock, S., R. Labarbe and C. Houssier. Biophys. J., **71**, 1519-1529 (1996).
- 6 - Flock, S., R. Labarbe and C. Houssier. Biophys. J., **70**, 1456-1465 (1996).
- 7- Bertolotto, J.A., M. G. Campo and P. Gradilone. Anales AFA, **12**, 193-197 (2000).
- 8- Bertolotto, J. A., G.M. Corral, E.M. Farías de La Torre and G. B. Roston. J. Phys.: Condens. Matter, **22**, 494101 (2010).
- 9- Brenner, H., Chem. Eng. Sci. **19**, 599-629 (1964).
- 10- Brenner, H., J. Colloid Interface Sci., **23**, 407-436 (1967).
- 11- Porschke, D., Biophys. Chem., **49**, 127-139 (1994).
- 12- Porschke, D. and J. M. Antosiewicz, J. Phys. Chem., **109**, 1034-1038 (2005).
- 13- Antosiewicz, J. M. and D. Porschke, J. Phys. Chem., **113**, 13988-13992 (2009).
- 14- Bertolotto, J. A. Physica A, **373**, 29-42 (2007).
- 15- Bertolotto, J.A., G. B. Roston, M. E. Ascheri and M. G. Campo, Physica A, **327**, 185-189 (2003).
- 16- Bertolotto, J.A., G. B. Roston and M. E. Ascheri, Prog. Colloid Polym Sci, **128**, 25-29 (2004).
- 17- Bertolotto, J.A., G. B. Roston, M. E. Ascheri and M. G. Corral, AIP Conference Proceedings, 151-156 (2007).
- 18- Umazano, J. P. and J. A. Bertolotto. Mec. Comp., **28**, 2509-2519 (2009).
- 19- Bertolotto, J. A., P. Willging, L. Pugnali and H. Bustos. Anales AFA, **5**, 486-488 (1993).
- 20- Kratky D. and G. Porod. Rec. Trav. Chain., **68**, 1106-1123 (1949).
- 21- Weers, L. Y. and NC. Stellwagen. Biopolymers, **61**, 261-275 (2002).
- 22- García de la Torre, J., G. del Río and A. Ortega. J. Phys. Chem., **111**, 955-961 (2007).
- 23- Manning, G. Biophys. Chem., **72**, 65-70 (1978).
- 24- Oosawa, F. Biopolymers, **9**, 677-688 (1970).