Capítulo 8

ANÁLISIS DE SOLUCIONES IRRADIADAS EN FORMA ESTACIONARIA

Irradiación continua

La irradiación continua consiste en iluminar una muestra con luz de una lámpara de intensidad constante. El tiempo de irradiación es variable y puede durar desde unos pocos segundos a horas. Si existe reacción fotoquímica durante una irradiación continua dicho proceso se denomina *fotólisis*. Para el estudio cinético de una fotólisis continua puede extraerse muestras a distintos tiempos de irradiación.

En la Figura 8.1 se muestra un esquema del dispositivo experimental para las irradiaciones continuas. La irradiación continua de luz UV se realizó empleando una lámpara Rayonet Photochemical Reactor Lamp, RPR 3500 Å de Southern N. E. Ultraviolet Co. Esta lámpara emite luz de 350 nm, con un ancho de banda de 20 nm.

Las soluciones a ser irradiadas se colocaron en celdas de 0.2 y 1 cm de camino óptico. En las celdas de 1 cm las muestras se agitaron magnéticamente para mantener su homogeneidad, evitando la acumulación de fotoproductos en la cara más cercana a la fuente de irradiación. El tiempo de irradiación se mide con cronómetro. El dispositivo se mantuvo con idéntica geometría en todos los experimentos con fines comparativos.

Se empleó una lámpara de 350 nm porque a esa longitud de onda las pterinas estudiadas absorben luz adecuadamente, mientras que las moléculas sobre las cuales se quiere estudiar los procesos de fotosensibilización no absorben luz en esa región del espectro, como es el caso de los nucleótidos y el ácido

desoxirribonucleico. En estas condiciones cualquier alteración de estas moléculas no puede ser atribuida a la acción directa de la irradiación, sino por el contrario a una reacción de fotosensibilización.

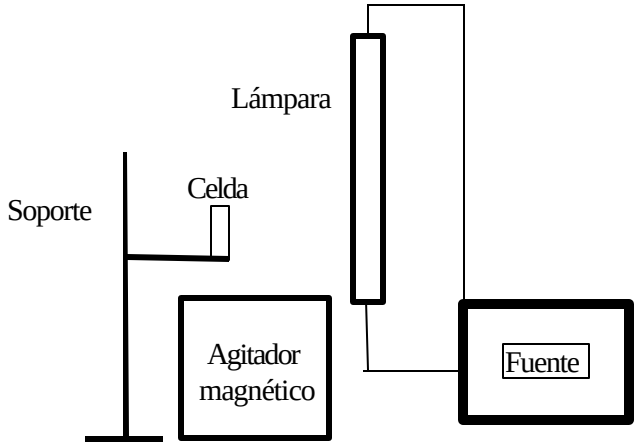

Figura 8.1: Esquema del dispositivo empleado para realizar las fotólisis continuas.

Como metodología general para los experimentos de irradiación continua se preparó una solución madre que corresponde al tiempo cero (t=0) de irradiación. Luego se coloca en una celda de cuarzo de volumen adecuado y con agitación (excepto en celdas de 0.2 cm, en las cuales no puede utilizarse agitación magnética) y se irradia durante tiempos variables.

Luego se somete la muestra a métodos de análisis. En algunos casos dichos métodos requieren de la extracción de la solución irradiada de la celda, mientras que en otros no. En este último caso, como por ejemplo si sólo se registran espectros de absorción, se interrumpe la iluminación (registrando muy bien el tiempo) se registra el espectro y se continúa con la misma. En caso contrario, se obtiene muestras a distintos tiempos de iluminación sobre alícuotas diferentes de la solución madre: se coloca una alícuota, se ilumina un tiempo y se retira en su totalidad para ser analizada. La cubeta se enjuaga exhaustivamente

cada vez que se cambia la solución. Las condiciones de volumen de la alícuota, geometría de irradiación, agitación deben mantenerse constantes. Se requiere la extracción de la muestra siempre que se realizó una cromatografía o una electroforesis.

Los experimentos se realizaron algunas veces en ausencia de oxígeno. Para evaluar su participación en las reacciones. Para ello se utilizó una celda de cuarzo con robinete. Las muestras se burbujearon con nitrógeno de máxima pureza por medio de un tubo de teflón.

Siempre se realizó un espectro UV-visible a la solución madre sin irradiar. Con ello se obtiene el espectro al tiempo cero (t=0) y por comparación con espectros conocidos se controla el pH y la concentración.

Electroforesis

Para analizar las alteraciones producidas a la molécula de ácido desoxirribonucleico luego de una irradiación continua y, como se mencionó anteriormente, para evaluar la pureza del ácido desoxirribonucleico durante su obtención, se aplicaron técnicas electroforéticas. Estas técnicas son herramientas básicas para la caracterización de macromóleculas, y se basan en que ellas son capaces de moverse cuando son colocadas en un campo eléctrico. En efecto, la electroforesis se define como la migración de partículas en una solución bajo la influencia de un campo eléctrico. Comprende un conjunto de métodos muy importantes para el fraccionamiento de los componentes de una mezcla [Skoog y West, 1990].

Para realizar la electroforesis se colocan las macromóleculas en un soporte sólido a un pH adecuado para que estas tengan carga. Luego se aplica un campo eléctrico, entonces la fuerza electromotriz moverá las macromoléculas hacia el ánodo o hacia el cátodo según posean carga negativa o positiva respectivamente. El soporte sólido está fijo y no se desplaza en el campo eléctrico. Para compensar el movimiento de las macromoléculas hacia un electrodo, los iones de la solución reguladora se desplazan hacia el otro.

El soporte sólido en una electroforesis se elige de acuerdo con las moléculas que se requieran separar. En biología molecular para separar moléculas de ácido desoxirribonucleico se emplean geles, generalmente de dos tipos: geles de poliacrilamida para separar fragmentos de hasta unos mil pares de bases, y geles de agarosa, más porosos, para resolver mezclas de fragmentos mayores.

Debido al tamaño de estas moléculas se decidió usar geles de agarosa. En los geles de agarosa se pueden detectar diferencias estructurales de una misma molécula de ácido desoxirribonucleico y diferencias de tamaño dentro de ciertos límites.

En dichos geles los plásmidos de ácido desoxirribonucleico se comportan de diferentes maneras según su estructura. Como se mencionó en el *Capítulo 4*, el plásmido es una molécula de ácido desoxirribonucleico circular que puede enrollarse de diferentes maneras o encontrarse relajado. Cada una de estas estructuras tiene diferente movilidad electrofóretica.

Para realizar una electroforesis se utiliza una unidad de alimentación, una cubeta de electroforesis, electrodos sumergidos en una solución reguladora aislados físicamente (pero no electrónicamente) del gel o soporte sólido. Pueden utilizarse o no colorantes para facilitar el revelado de la electroforesis. En este trabajo de tesis se utilizó bromuro de etidio para el revelado. El bromuro de etidio se fija al ácido desoxirribonucleico, produce una fluorescencia característica con luz UV.

El voltaje aplicado, la concentración de la solución reguladora, la concentración de agarosa del gel pueden modificarse para mejorar la calidad de la resolución de la muestra.

Los geles se prepararon en solución reguladora TBE (Tris-Bórico-EDTA) con una concentración 0.8% de agarosa, con bromuro de etidio. Se utilizó un voltaje de 100 a 120 volts.

Una vez realizada la corrida electroforética el gel se observa con luz UV. Se observan bandas fluorescentes en los sitios donde se encuentra el ácido desoxirribonucleico debida a su unión a bromuro de etidio.

Los geles se colocan en un equipo fotográfico Fotodyne que consta de un transiluminador con luz UV y una cámara fotográfica Polaroid. Al encender el

transiluminador se observa una intensa fluorescencia en los sitios del gel donde se halla el ácido desoxirribonucleico.

Esto se registra fotográficamente. Las fotos se copian con un scanner, y la imagen digital obtenida se utiliza para poder estudiar la intensidad de luz de cada banda que en ella aparece. Para ello se utiliza el programa Sigmagel de Jandel Corporation.

Cromatografía en capa delgada

La cromatografía abarca un grupo de métodos de separación, aislamiento e identificación. Existen numerosas variantes, pero todas las cromatografías constan de una fase móvil y otra estacionaria. Los componentes de una mezcla se transportan a través de una fase estacionaria por medio de una fase móvil. Los componentes de la muestra se encuentran disueltos en la fase móvil. Las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración de los componentes de la mezcla [Skoog y West, 1990].

La cromatografía de partición en capa delgada es usada habitualmente para separar mezclas de compuestos polares. La utilización de este método como adecuado para separar estructuras pterínicas ya ha sido publicado en literatura [Scott, 1980; McCormack y Newman, 1985]. En base a ello en el presente trabajo se utilizó cromatografía de partición en capa delgada para separar pterinas de nucleótidos. Los nucleótidos tienen estructuras orgánicas aromáticas similares a las pterinas, por ello en primer término se ensayaron estas cromatografías reportadas para pterinas. Se encontró que su utilización para separar soluciones con mezclas de pterinas y nucleótidos es adecuada.

El método consiste en utilizar celulosa como fase estacionaria y soluciones acuosas o mezclas de solventes polares como fase móvil. La celulosa admite volúmenes importantes en la siembra y permite usar agua como solvente de corrida.

El objetivo de estas cromatografías fue separar las pterinas de los nucleótidos para observar posibles cambios en los nucleótidos luego de ser sometidos a irradiación continua en presencia de aquéllas.

Se utilizaron placas de celulosa de 250 μm con marcador fluorescente de Sigma-Aldrich.

Como solvente se utilizaron soluciones acuosas de $ClNH_4$ en concentración de 0.3 % como fase móvil. Las velocidades relativas de migración y la resolución de las bandas de los compuestos dependen de la concentración de la sal, por ello se realizaron muchos ensayos antes de elegir la concentración de $ClNH_4$ adecuada.

La ubicación de las especies sobre las placas puede determinarse de varias formas. En este trabajo se aprovecharon las propiedades fluorescentes que presentan de las pterinas al ser irradiadas con luz UV-A: al exponer la placa a luz de 350 nm la pterina presenta fluorescencia en forma característica, no así los nucleótidos ni el indicador fluorescente que posee la placa. Bajo luz de 350 nm, las manchas correspondientes a pterina se observan de color azul sobre un fondo oscuro. De esta forma, se puede entonces distinguir a la pterina inequívocamente. Se localizó por separado a los nucleótidos, a exponer la placa a luz de 254 nm. El indicador fluorescente emite al ser irradiado con luz de dicha longitud de onda, y los lugares de la placa ocupados por alguna sustancia se ven opacos. Así las manchas se muestran oscuras sobre un fondo fluorescente. Como la pterina ya ha sido ubicada por luz UV-A, las manchas restantes corresponden a los nucleótidos o sus productos. Además, la pterina también presenta fluorescencia al exponerse a luz de 254 nm. Por ello las manchas de pterinas no se ven opacas, sino por el contrario como manchas fluorescentes celestes muy tenues que se distinguen del fondo, que también presenta fluorescencia, pero de color amarillo.

En estos ensayos se observaron cambios químicos y cambios de concentración. Los cambios químicos se observan como cambios en la velocidad de migración de cada componente. Los cambios en la concentración se reflejan en la intensidad de cada mancha.

Las corridas se realizaron sembrando en una misma placa la solución madre de pterina y nucleótidos (sin irradiar) y la misma solución irradiada. Se sembró idéntica cantidad de gotas

Medidas electroquímicas de oxígeno.

La concentración del O_2 disuelto en las soluciones irradiadas de pterinas y nucleótidos fue determinada electroquímicamente. Se utilizó un electrodo sensible a O_2 (Orion, modelo 37-08-99). Para realizar estas medidas se recurrió al uso de una celda de vidrio pirex provista de cierre hidráulico. Dentro de ella se colocó el electrodo y la solución a irradiar. Este dispositivo permite irradiar la solución y determinar si durante la irradiación ocurre una variación en la concentración del oxígeno disuelto. El electrodo posee en su extremo un buzo magnético, otro se colocó en el fondo de la celda. Un agitador magnético se ubicó por debajo de la celda, de modo tal que las soluciones fueron agitadas durante los experimentos. Por otra parte, la celda se llena completamente con la solución a analizar y el electrodo se ajusta de manera tal que no se permite el intercambio de gases durante el experimento. Además, la membrana del electrodo está protegida de la luz UV durante la irradiación por un dispositivo plástico.

Una vez que se prepara todo el dispositivo, se realiza la medida de la concentración de O_2 en la solución antes de ser irradiada. Es necesario puntualizar que, en todos los experimentos llevados a cabo con esta técnica, se emplearon soluciones iniciales saturadas en aire. Finalmente se inicia el experimento de fotólisis estacionaria y, sin apagar la lámpara, se efectúan las medidas a distintos tiempos de irradiación.

Se realizó un experimento control para descartar que la disminución en la concentración de O_2 observada pudiera deberse al descenso en la solubilidad del mismo como consecuencia del calentamiento producido por la lámpara. Si bien el aumento de la temperatura de la solución es de sólo unos pocos grados centígrados (aproximadamente 3 ^{0}C), este efecto debía ser tenido en cuenta por la fuerte dependencia con la temperatura que muestra la solubilidad del O_2 en H_2O.

El resultado de este control (Figura 8.2) muestra que se produce un ligero descenso de la concentración de O_2 en los primeros minutos de irradiación para luego alcanzar un valor que se mantiene con ligeras oscilaciones. Estos cambios, como se verá cuando se presenten los resultados, pueden despreciarse frente a los cambios observados en las fotólisis que transcurren con consumo de O_2.

Las medidas electroquímicas de O_2 disuelto en el medio durante las fotólisis sirvieron para determinar si dicho gas participaba o no en las reacciones fotoquímicas estudiadas. Sin embargo, estos resultados no pudieron ser comparados cuantitativamente con aquéllos obtenidos en otros experimentos, pues las condiciones experimentales diferían mucho a causa del dispositivo especial empleado para estas medidas.

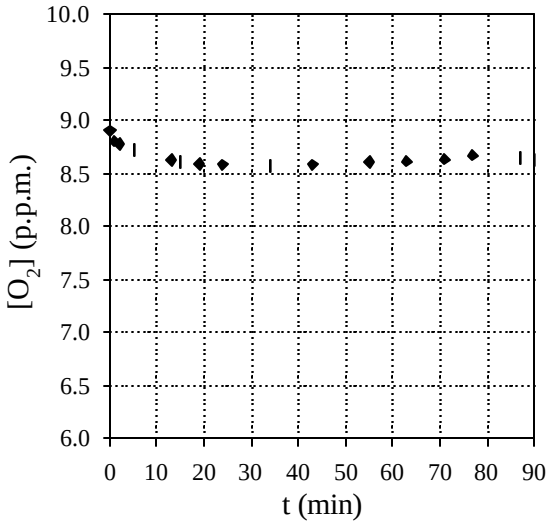

Figura 8.2. Medida de la concentración de O_2 en H_2O bajo irradiación. Este control se realizó respetando las condiciones y geometría empleadas en las fotólisis y con la misma lámpara.