

INTRODUCCION.

En este trabajo se analiza el comportamiento de la molécula biológica ADN, en solución acuosa, mediante la determinación de algunas de sus propiedades electo-ópticas. Se estudia en particular la birrefringencia eléctrica de soluciones de esa macromolécula.

En 1875 KERR <1> descubre que la mayoría de los líquidos se vuelven birrefringentes cuando en ellos actúa un campo eléctrico. La aplicación de este fenómeno al estudio de soluciones de macromoléculas y coloides comienza en el año 1950 con los trabajos de BENOIT, O'KONSKI y TINOCO <2. 3 y 4>. El método empleado permite conocer propiedades eléctricas, ópticas e hidrodinámicas de las moléculas así como su estado de agregación, flexibilidad y polidispersión.

El sistema para la determinación experimental de la birrefringencia inducida por un campo eléctrico consiste en una celda que contiene la solución que se pretende estudiar entre dos electrodos planos paralelos. A estos se les aplica un pulso de tensión rectangular. La birrefringencia originada en la solución se transforma en una variación de intensidad luminosa con un sistema óptico adecuado y la señal fotoeléctrica resultante se registra conjuntamente con el pulso eléctrico en la pantalla de un osciloscopio. En la Figura 1 se muestra un oscilograma con la señal de birrefringencia y el pulso eléctrico aplicado.

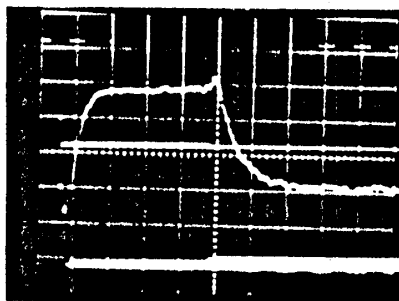


Figura 1

La señal de birrefringencia crece primero hasta llegar a un estado estacionario que corresponde a un grado de orientación máximo de las moléculas para luego decaer al suprimir el campo eléctrico.

Se suele aplicar a la solución dos pulsos de tensión rectangulares consecutivos y de polaridad opuesta, de forma de invertir rápidamente el campo eléctrico que actúa sobre las moléculas. Esta técnica llamada de "pulsos inversos" permite establecer si el mecanismo de orientación molecular es por momento permanente, por momento inducido o una combinación de ambos. En este último caso se puede determinar en que proporción intervienen uno con respecto al otro.

P. COLSON ⁽⁵⁾ mientras estudiaba el efecto del ultrasonido en soluciones de ADN y nucleohistona encontró una inversión en el signo de la birrefringencia eléctrica en soluciones de ADN degradado por ese método. Además las señales de fotocorriente presentan formas particulares no previstas por la teoría de la birrefringencia eléctrica de macromoléculas y coloides.

El ADN nativo tiene una birrefringencia eléctrica negativa originada por la elevada polarizabilidad óptica en la dirección perpendicular al eje de la molécula.

El origen de la birrefringencia eléctrica del ADN sonificado permanece oscuro hasta el presente y su análisis es el motivo del presente trabajo.

En la referencia 5 se estudia el efecto del tiempo de sonicación en las formas de las señales de la birrefringencia eléctrica. Las señales que se muestran en la Figura 2 corresponden a una intensidad de campo eléctrico $E < 1,5 \text{ KV/cm}$ y los tiempos de sonicación son los siguientes: (a) : 1 min. ; (b) 2 min. ; (c) : 3 min. : (d) : 5 min.

COLSON y otros ⁽⁵⁾ presentan algunas características de este fenómeno. En la Figura 3 se muestran las señales de fotocorriente que aparecen al aplicar pulsos de tensión simples e inversos a una solución de ADN sonificado (5 min. o mas) para distintas intensidades de campo eléctrico, decre-

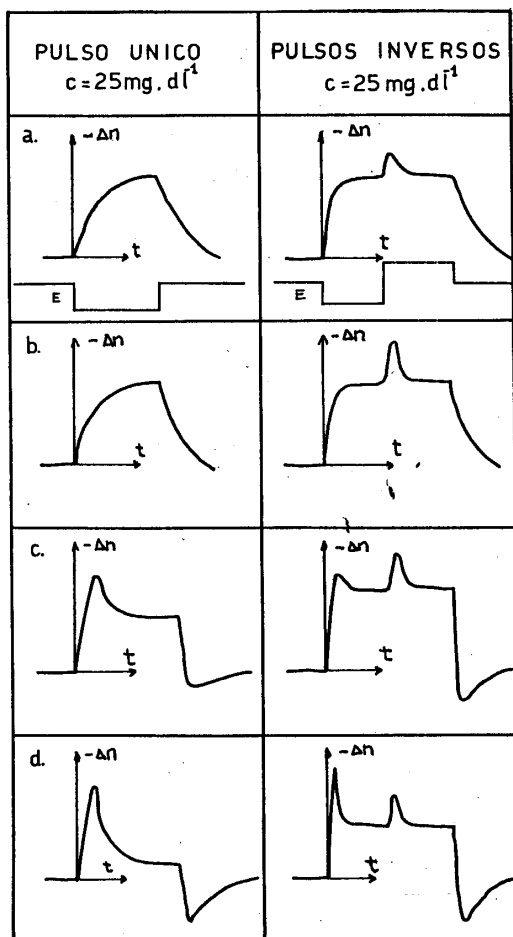


Figura 2

ciendo desde a. ($E=2,5$ KV/cm) hasta f. ($E=0,2$ KV/cm). En ella se observa como la birrefringencia eléctrica es positiva para campos eléctricos pequeños mientras que se transforma en negativa para campos eléctricos elevados pasando por señales donde se mezclan ambas contribuciones. Puede verse además que los tiempos de relajación de las señales positiva y negativa son bastante diferentes, del orden de 30 μs para la señal negativa y de 200 μs para la positiva.

La técnica de pulsos inversos permite apreciar una contribución importante de un momento dipolar permanente en la

señal positiva de la birrefringencia eléctrica.

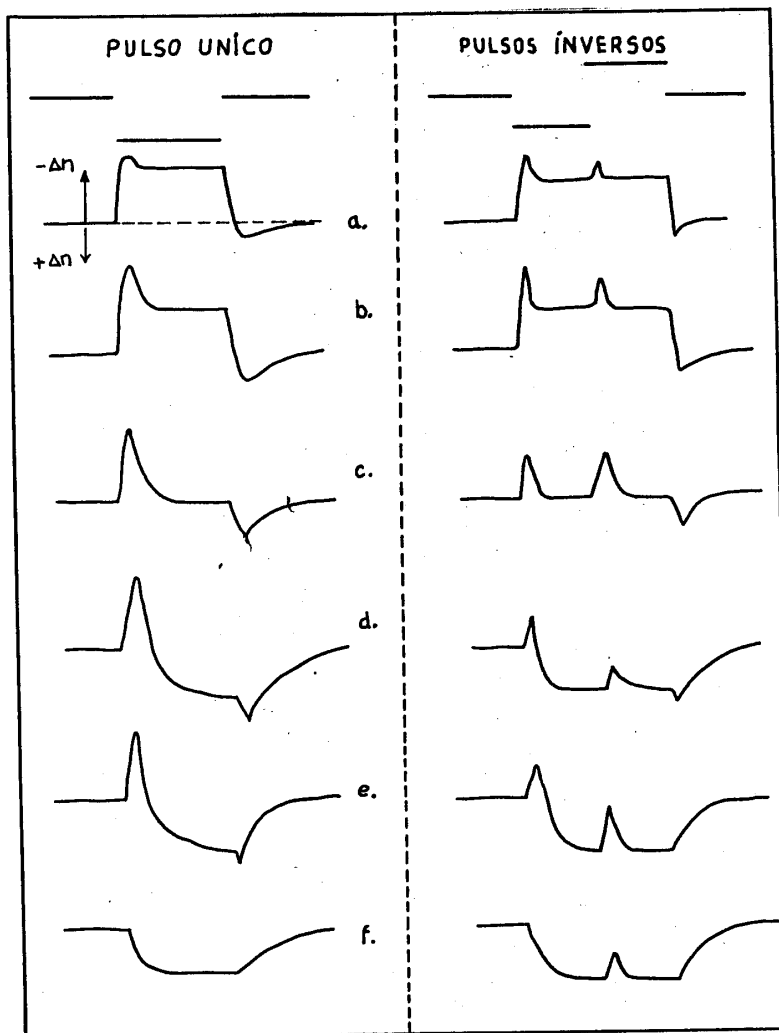


Figura 3

La Figura 4 exhibe la variación de la birrefringencia eléctrica del ADN sonicado con el cuadrado del campo eléctrico. En esa experiencia el tiempo de sonicación es de 90 min. a 20 kHz; las soluciones tienen NaCl 1 mM, pH 6,6 y la concentración del ADN es de 73,5 mg/dl. En la Figura 4 se incluye también la curva ampliada correspondiente a campos eléctricos pequeños.

La contribución positiva de la birrefringencia eléctrica aumenta apreciablemente con la concentración del ADN en las soluciones.

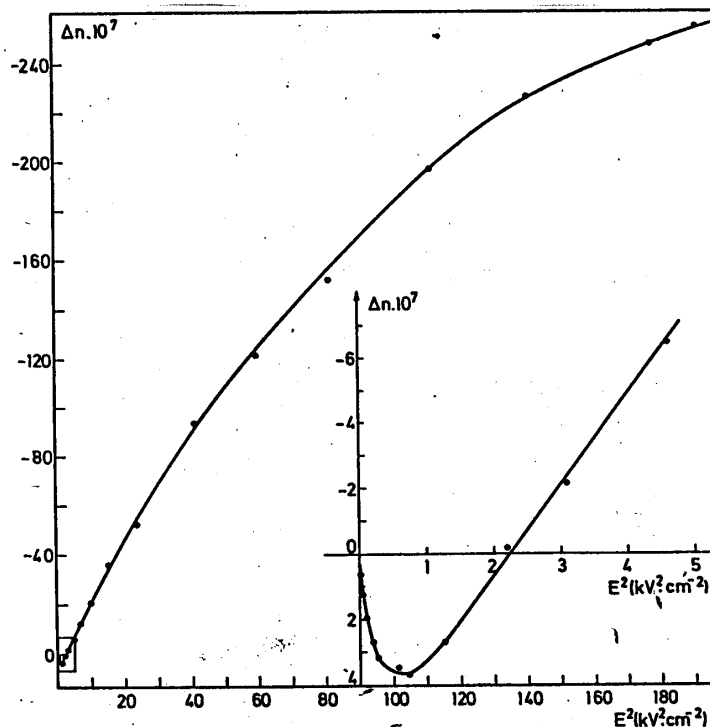


Figura 4

Un resultado interesante descrito en la ref.5 es el que se refiere a mediciones de dicroísmo del complejo ADN (sonicado)-proflavina en la banda de absorción visible del complejo (460nm). La proflavina es un colorante cuyo anillo se intercala entre las bases del ADN, es decir se dispone perpendicularmente al eje de la macromolécula. El dicroísmo del complejo ADN(nativo)-proflavina es negativo. Sin embargo el dicroísmo del complejo con ADN sonicado presenta una componente positiva.

En la discusión de la ref.6 se establece que no se puede pensar en una sola entidad con un momento permanente transversal al eje molecular pues si bien este explica la inversión en el signo de la birrefringencia eléctrica no predice

el transitorio que se observa al suprimir el campo eléctrico. En ese mismo artículo se dice que la interpretación más probable de este problema es la que invoca la existencia de dos entidades moleculares distintas orientadas independientemente por el campo eléctrico. Esta hipótesis explica la forma de las señales de birrefringencia eléctrica y la inversión de su signo y se esquematiza en la Figura 5. En ella:

- (a) representa la curva experimental de la cual se obtienen las curvas (b) y (c) por descomposición.
- (b) Es la curva correspondiente a la entidad con birrefringencia negativa $\Delta n(-)$.
- (c) Es la curva correspondiente a la entidad con birrefringencia positiva $\Delta n(+)$.

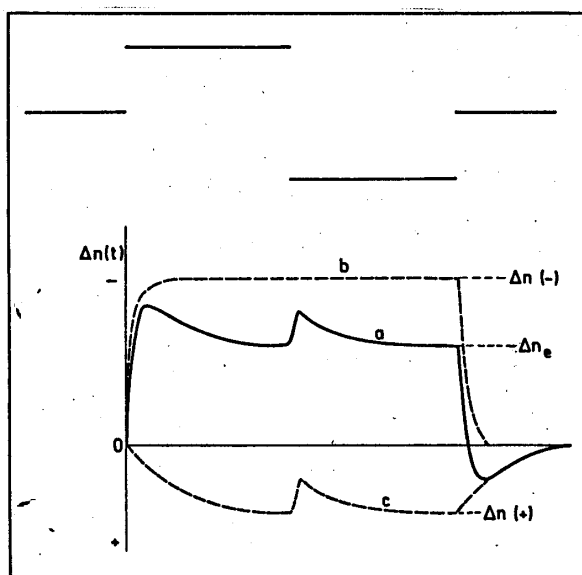


Figura 5

La componente con birrefringencia negativa, $\Delta n(-)$ se orienta mediante un momento dipolar inducido puro y correspondería a la molécula de ADN sonificado con el tiempo de relajación menor. La componente con birrefringencia positiva $\Delta n(+)$ tiene un momento dipolar permanente

importante y se debería a algún tipo de agregado, correspondiéndole el tiempo de relajación mayor. La contribución positiva de la birrefringencia alcanza la saturación para campos eléctricos pequeños (1,5 KV/cm). No se verifica experimentalmente la existencia de agregados en las soluciones de ADN sonicado.

Existen varios trabajos en la literatura científica que se refieren a sustancias que presentan una inversión en el signo de la birrefringencia eléctrica. A continuación se resumen dos de ellos, los cuales han sido elegidos por tratarse de sistemas que tienen un comportamiento muy similar al de las soluciones de ADN sonicado.

Inversión del signo de la birrefringencia eléctrica de suspensiones de bentonita.

Este comportamiento de las suspensiones de bentonita, fue descrito por SHAH y otros (7). La bentonita dispersada en agua se fracciona por ultracentrifugación y se dializa 10 a 30 días en agua desmineralizada. Con microscopio electrónico se determinan las dimensiones de las partículas que presentan la forma de escamas. Se emplean cinco muestras monodispersas en un 70%, con partículas de 100 a 150 Å de espesor y un promedio de semiejes ($r=(ab)^{1/2}$) comprendido en el rango 2500-6000 Å.

Las mediciones de birrefringencia eléctrica muestran que las suspensiones de bentonita poseen una birrefringencia negativa para campos eléctricos pequeños, aún a bajas concentraciones, y cambia su signo al aumentar el campo eléctrico. Se observa que el valor mínimo de la birrefringencia y el campo eléctrico de inversión decrecen al aumentar el promedio de semiejes, r . Se analiza la dependencia con la concentración de bentonita de las curvas del retardo óptico específico, δ/c versus la intensidades de campo eléctrico. El retardo óptico δ es una magnitud proporcional a la birrefringencia (ecuación I.1). Estas gráficas se muestra en la Figura 6, donde se aprecia que δ_{\min}/c y el campo

eléctrico al cual cambia su signo, E_{inv} , decrecen al reducir la concentración de las muestras. Además se verifica que δ_{min}/c vs. la concentración se relacionan linealmente. En la Figura 6 se extrapola δ/c para $c \rightarrow 0$; la curva extrapolada sugiere que la inversión de la birrefringencia persiste aún

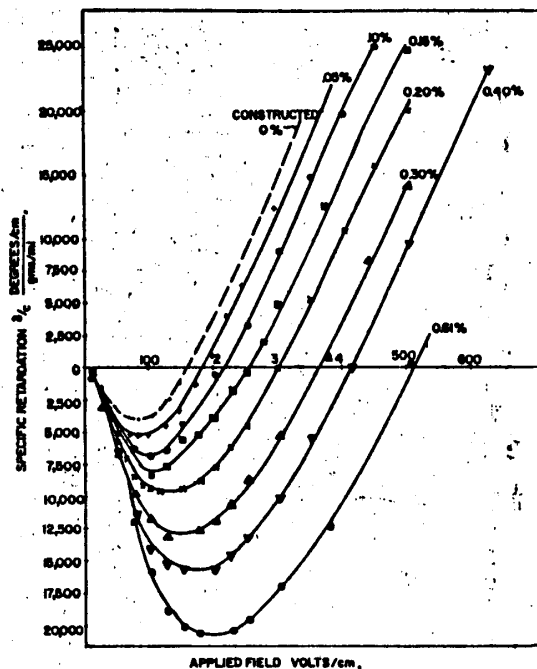


Figura 6 (de la referencia 7)

para soluciones muy diluidas. El tiempo de relajación de la birrefringencia eléctrica casi no varía para concentraciones de hasta 0,3% pero crece rápidamente arriba de este valor.

Se concluye que aunque la interacción entre partículas juega un rol importante en aumentar la birrefringencia negativa, las partículas de bentonita la presentan aún en ausencia de interacciones (para $c \rightarrow 0$) y por lo tanto la inversión de la birrefringencia es debida a una propiedad intrínseca de las mismas.

Se realizaron mediciones de birrefringencia con campos eléctricos sinusoidales y cuadrados a varias frecuencias. Estas mediciones indicaron que las partículas tienen un momento dipolar permanente en la dirección de su eje de

simetría que las lleva a orientar de manera perpendicular a su alineación en campos eléctricos grandes. Para campos eléctricos mayores predomina una orientación por momento inducido sobre la superficie de la partícula (perpendicular al eje de simetría de la misma) y da origen a una birrefringencia positiva. Esto se esquematiza en la Figura 7.

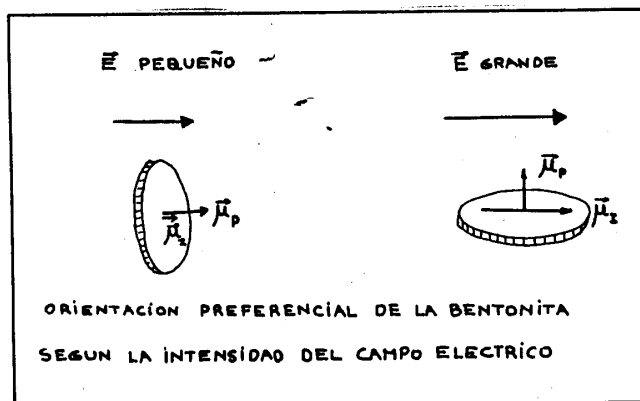


Figura 7

La birrefringencia negativa para campos eléctricos continuos pequeños verifica la ley de Kerr.

Inversión del signo de la birrefringencia eléctrica de soluciones del virus del mosaico del tabaco:

El virus del mosaico del tabaco presenta características electo-ópticas similares a las del ADN sonicado. ASAI H. y WATANABE N.⁽⁸⁾ analizan el efecto en la birrefringencia eléctrica de la concentración de virus en las soluciones. Emplean TMV clase comun (tipo OM) y TMV clase Holmes Rib Grass (clase HB).

Para soluciones de TMV clase comun con concentraciones menores que 0.03% el retardo óptico es positivo lo que indica que la molécula se orienta con su eje de simetría en la dirección del campo eléctrico. La birrefringencia eléctrica, Δn , es proporcional a E^2 para campos pequeños y también es

proporcional a la concentración de TMV. Los tiempos de crecimiento y decaimiento de la birrefringencia eléctrica son iguales a 0,8ms. La longitud de la molécula es de 4000Å. El TMV(OM) no presenta momento dipolar permanente.

El TMV(clase HR) para concentraciones menores que 0,05% presenta un retardo óptico proporcional a E^2 y a la concentración. El tiempo de crecimiento de la birrefringencia es de 0,73ms y el tiempo de decaimiento de 0,5ms. La molécula presenta un momento dipolar permanente a lo largo de su eje estimado entre $1,4 \times 10^{-4}D$ y $2,0 \times 10^{-4}D$.

La birrefringencia eléctrica se hace negativa para concentraciones grandes de ambas clases de TMV. Según los autores mencionados arriba esto significa que la molécula se orienta con su eje de simetría perpendicular al campo eléctrico. Para campos eléctricos pequeños la birrefringencia negativa verifica la ley de Kerr. Al aumentar la intensidad de campo la birrefringencia eléctrica disminuye hasta cambiar su signo. Aún para concentraciones muy elevadas Δn es positiva para E grande. La concentración crítica para la cual Δn se hace menor que 0 es mayor para el TMV(HR) que para el TMV comun.

La birrefringencia eléctrica se vuelve positiva al aumentar el pH de la solución de TMV(HR). Para el TMV común la dependencia es la misma pero menos significativa.

El campo eléctrico de inversión decrece al aumentar la concentración de buffer. La adición de sal hace que la birrefringencia eléctrica sea mas normal.

Los transitorios de la birrefringencia eléctrica de soluciones concentradas de TMV se muestran en la Figura 8. Para campos eléctricos elevados Δn y sus transitorios se vuelven positivos. El tiempo de relajación no depende mucho de la concentración de las soluciones ni de la intensidad del campo eléctrico. El tiempo de relajación para soluciones de concentración elevada es a lo sumo el doble que el de las soluciones diluidas. Como el tiempo de relajación es proporcional a L^3 , donde L es la longitud del virus, esto fue interpretado como que las moléculas no están significativa-

mente agregadas.

La teoría de la birrefringencia eléctrica de macromoléculas y coloides muestra que si una molécula tiene un gran

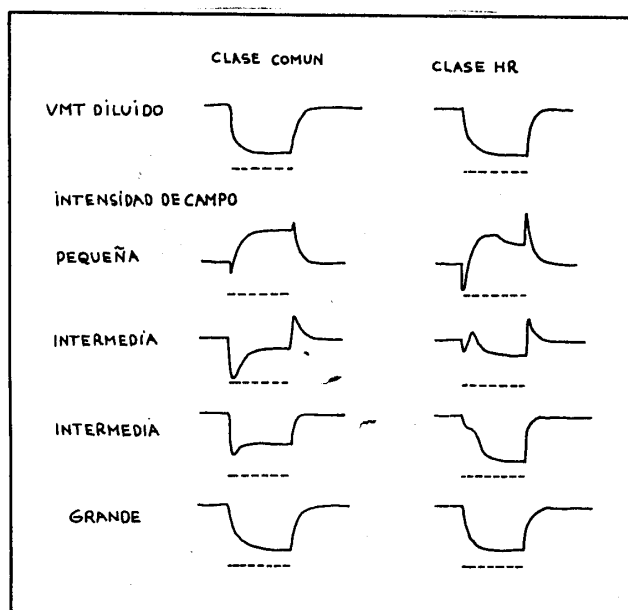


Figura 8

dipolo permanente perpendicular a su eje mayor, la birrefringencia eléctrica presenta un signo para campos eléctricos pequeños y el opuesto para campos suficientemente elevados.

Esto se debe a que el torque orientador para el momento dipolar inducido es proporcional a E^2 mientras que para el momento dipolar permanente es proporcional a E . Los autores mencionados arriba dicen que las relaciones entre la birrefringencia eléctrica y el campo que se obtienen con esta teorías son (contrariamente al caso de las soluciones concentradas de TMV) esencialmente independientes de la concentración. Concluyen entonces que la molécula de TMV común, la cual no tiene un momento dipolar permanente en solución diluida, tiene un momento dipolar permanente "aparente"

perpendicular a su eje mayor en solución concentrada. El TMV(HR) presenta el mismo comportamiento pero la birrefringencia negativa aparece para concentraciones mayores que en el virus común debido al gran momento dipolar permanente a lo largo de su eje mayor.

Los autores mencionados afirman, como se hace frecuentemente, que la teoría de los transitorios de la birrefringencia eléctrica predice que la curva de decaimiento después de suprimir el campo eléctrico debe ser exponencial para una solución monodispersa y diluida. Luego infieren que los transitorios y diagramas anómalos (Figura 8) que aparecen justo antes o después de aplicar el campo eléctrico se deben a interacciones estéricas o eléctricas entre las moléculas en solución. Además excluyen que el efecto anómalo se deba a una agregación lateral o longitudinal de las moléculas, a influencia de las paredes de los electrodos de la celda de Kerr o a un efecto electroforético.