



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

**“PROPIEDADES ELÉCTRICAS Y ÓPTICAS DEL ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEICO”**

Juan Pablo Umazano

Director: Dr. J. Raúl Grigera
Codirector: Dr. Jorge A. Bertolotto

Tesis propuesta para optar por el título de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas
de la Universidad Nacional de La Plata

-- Marzo de 2011 --

Umazano, Juan Pablo

Propiedades eléctricas y ópticas del ácido desoxirribonucleico. - 1a ed. - La Plata :
Universidad Nacional de La Plata, 2011.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0814-8

1. ADN. 2. Tesis de Doctorado. I. Título
CDD 572.877

Fecha de catalogación: 25/11/2011

A mis Padres, Juan Aldo y María Esther.

A mis hermanos, Aldo Martín y Cesar Matías.

Especialmente, a mi esposa Ivana.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), institución de la cual he sido Becario.

A la Universidad Nacional de La Pampa, institución de la cual también fui Becario.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa y al Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (CCT La Plata-CONICET-UNLP), instituciones que me brindaron el espacio físico para realizar mi Doctorado.

Al Dr. J. Raúl Grigera, quien me dirigió a lo largo de este proceso.

Al Dr. Jorge A. Bertolotto, quien contribuyó a través de su codirección.

A mis compañeros del Departamento de Física de la FCEyN (UNLPam), por el apoyo brindado.

RESUMEN

Las soluciones macromoleculares se convierten en birrefringentes y dicroicas al aplicar sobre ellas un campo eléctrico externo. Tanto la birrefringencia como el dicroísmo eléctricos se deben a que las moléculas en solución tienen, en general, propiedades ópticas anisotrópicas, y a que el campo eléctrico induce para éstas una orientación preferencial en el espacio.

En el presente trabajo se estudia la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de la molécula ácido desoxirribonucleico (ADN) en solución salina. Se proponen tres objetivos específicos que, aunque se definen en términos de aplicaciones al ADN, contribuyen al desarrollo de las teorías electro-ópticas y a su aplicación a soluciones macromoleculares en general.

El primer objetivo es analizar el efecto de la electroforesis junto con el acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación de moléculas rígidas sobre la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos del ADN. A tal fin se resuelve la ecuación de Fokker-Planck del sistema y se obtiene la función de distribución orientacional de las moléculas al aplicar el campo eléctrico, una vez alcanzado el estado estacionario. Los resultados obtenidos muestran que el acoplamiento hidrodinámico influye en las señales electro-ópticas en un amplio rango de intensidades de campo eléctrico, aunque resulta particularmente importante para intensidades relativamente bajas. Los desarrollos teóricos realizados se utilizan para ajustar datos experimentales de dicroísmo eléctrico de soluciones de ADN sonificado.

El segundo objetivo consiste en estudiar el efecto del tamaño finito de las moléculas con respecto a la longitud de onda de la luz sobre las propiedades ópticas del ADN. El estudio se realiza utilizando la aproximación de dipolos discretos para describir las propiedades ópticas de las moléculas. Los resultados demuestran la importancia de incluir la inhomogeneidad del campo eléctrico de la luz incidente a través de las partículas y las interacciones intramoleculares, para estudiar cómo las diferentes partes de una molécula contribuyen a las propiedades ópticas de la misma.

El tercer y último objetivo es estudiar la orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico con métodos de simulación computacional. En virtud de la relativamente baja capacidad de cálculo que requiere, en este trabajo se optó por utilizar simulación dinámica de

Langevin. Las moléculas se describen mediante un modelo simple constituido por una cadena de subunidades esféricas unidas mediante potenciales elásticos. Se introduce una función de orientación que describe el orden orientacional de las moléculas al aplicar un campo eléctrico. Los resultados muestran como el grado orientacional incrementa con la intensidad del campo eléctrico y como este orden tiende hacia la saturación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	8
Consideraciones teóricas generales sobre la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de soluciones.....	8
1.1 Introducción.....	8
1.2 Sobre las descripciones clásica y cuántica de la interacción de la luz con la materia.....	9
1.3 Birrefringencia eléctrica de soluciones.....	10
1.4 Dicroísmo eléctrico de soluciones.....	12
CAPÍTULO 2	16
Birrefringencia y dicroísmo eléctricos de soluciones de ADN.....	16
2.1 Introducción.....	16
2.2 Modelo de macroión tipo arco (MTA).....	17
2.3 Birrefringencia eléctrica del ADN empleando el modelo de macroión tipo arco (MTA).....	18
2.4 Dicroísmo eléctrico reducido del ADN empleando el modelo de macroión tipo arco (MTA).....	19
CAPÍTULO 3	21
Orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico.....	21
3.1 Introducción.....	21
3.2 Hidrodinámica de partículas rígidas de forma arbitraria.....	22
3.2.1 Generalidades.....	22
3.2.2 Propiedades de los tensores de fricción.....	24
3.2.3 Propiedades de los tensores de difusión.....	24
3.3 Propiedades eléctricas, ópticas e hidrodinámicas del modelo de macroión tipo arco (MTA) y sistemas de coordenadas.....	25
3.3.1 Propiedades físicas.....	25
3.3.2 Sistemas de coordenadas.....	26
3.4 Ecuación de Langevin.....	28
3.5 Ecuación de Fokker-Planck.....	29

3.6 Resolución numérica de la ecuación de Fokker-Planck.....	33
CAPÍTULO 4.....	38
Análisis teórico de las diferentes contribuciones a la birrefringencia y al dicroísmo eléctricos de soluciones de fragmentos de ADN.....	38
4.1 Introducción.....	38
4.2 Resultados y discusión.....	39
4.2.1 Dicroísmo eléctrico.....	39
4.2.2 Birrefringencia eléctrica.....	45
4.2.3 Analogía entre los resultados obtenidos para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos.....	47
4.3 Conclusiones del capítulo.....	48
CAPÍTULO 5.....	50
Mediciones del dicroísmo eléctrico de soluciones de ADN sonicado. Ajustes teóricos.....	50
5.1 Introducción.....	50
5.2 Procedimiento experimental.....	50
5.2.1 Preparación de las muestras.....	50
5.2.2 Equipo experimental para medir el dicroísmo eléctrico reducido (DER).....	51
5.2.3 Determinación experimental del dicroísmo eléctrico reducido (DER) en función del campo eléctrico.....	51
5.3 Resultados y discusión.....	52
5.3.1 Caracterización de soluciones de ADN sonicado.....	52
5.3.2 Dicroísmo eléctrico reducido (DER) de soluciones de ADN sonicado.....	53
5.4 Conclusiones del capítulo.....	55
CAPÍTULO 6.....	57
Propiedades ópticas de fragmentos de ADN con dimensiones comparables a la longitud de onda.....	57
6.1 Introducción.....	57
6.2 Modelo Molecular.....	57
6.3 Interacción de la luz con las moléculas.....	59
6.3.1 Descripción general.....	59
6.3.2 Análisis microscópico de la polarización.....	60

6.4 Birrefringencia eléctrica.....	63
6.5 Absorción de luz y polarizabilidad óptica.....	63
6.6 Incremento del índice de refracción de la solución con respecto al del solvente.....	64
6.7 Resultados y discusión.....	65
6.7.1 Polarizabilidad óptica de los osciladores a partir de datos experimentales del especto de absorción.....	65
6.7.2 Polarizabilidad óptica de los osciladores a partir de Δn_{rs} y δn_r	70
6.7.3 Influencia de las interacciones.....	72
6.7.4 Comparación con las teorías de uso habitual.....	72
6.8 Conclusiones del capítulo.....	73
CAPÍTULO 7.....	75
Orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico. Un estudio mediante simulación computacional.....	75
7.1 Introducción.....	75
7.2 Simulación dinámica de Langevin.....	76
7.3 Modelo.....	77
7.4 Cálculo y análisis de resultados.....	78
7.4.1 Procedimiento de simulación.....	78
7.4.2 Análisis de la flexibilidad de las moléculas.....	79
7.4.3 Distribución radial de iones.....	81
7.4.4 Función de orientación en un campo eléctrico.....	83
7.5 Conclusiones del capítulo.....	85
CONCLUSIONES GENERALES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXO.....	93
Trabajos publicados.....	93

INTRODUCCIÓN

En muchas sustancias líquidas, que en condiciones ordinarias presentan propiedades ópticas isotrópicas, puede inducirse anisotropía óptica mediante la acción de diferentes agentes externos, tales como fuerzas hidrodinámicas, campos eléctricos o magnéticos. Los diferentes agentes externos tienen como propósito orientar en el espacio a las moléculas de la solución. En particular, en el presente trabajo estamos interesados en la presencia de un campo eléctrico como mecanismo externo de orientación. En tal circunstancia, la solución se manifiesta birrefringente y dicroica. En virtud de su origen es habitual referirse a estos fenómenos con los nombres de birrefringencia y dicroísmo eléctricos. Cada uno de ellos constituye una técnica útil para el estudio de las propiedades físicas de macromoléculas en solución.

La birrefringencia eléctrica se define como la diferencia entre los índices de refracción que presenta la solución para luz incidente linealmente polarizada según las direcciones paralela y perpendicular a la dirección del campo eléctrico aplicado. De manera semejante, el dicroísmo eléctrico se define como la diferencia entre las absorbancias que presenta la solución para luz incidente linealmente polarizada según estas mismas direcciones.

Los primeros estudios sobre la birrefringencia eléctrica se remontan hasta el año 1875, cuando Kerr¹ descubrió que las sustancias líquidas se vuelven birrefringentes en presencia de un campo eléctrico externo. Él determinó experimentalmente que la birrefringencia eléctrica en líquidos puros depende linealmente con el cuadrado de la intensidad del campo eléctrico, una relación que hoy se conoce como ley de Kerr. Posteriormente, ya promediando el siglo XX comenzaron a desarrollarse las teorías electro-ópticas y sus aplicaciones a soluciones de macromoléculas. Entre los primeros trabajos al respecto se encuentra el realizado por O'Konski et al.², quienes estudiaron la birrefringencia eléctrica de macromoléculas rígidas con propiedades eléctricas y ópticas con simetría cilíndrica. Posteriormente, el trabajo de O'Konski et al. fue extendido por Holcomb y Tinoco³ al caso de macromoléculas rígidas sin simetría cilíndrica en sus propiedades eléctricas y ópticas. A su vez, estos autores demostraron la aplicabilidad de la teoría de la birrefringencia eléctrica al caso del dicroísmo eléctrico bajo la sola sustitución del tensor polarizabilidad óptica por el tensor probabilidad de transición. Como explicaremos más adelante, estas teorías no son por completo adecuadas

para describir resultados experimentales de soluciones de fragmentos de la molécula ácido desoxirribonucleico (ADN).

Electro-óptica del ácido desoxirribonucleico (ADN). Efecto anómalo

En general, la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN en solución salina (NaCl) son negativos. Esto se debe a que las transiciones electrónicas en el ADN ocurren predominantemente en el plano de sus bases. Sin embargo, bajo ciertas condiciones experimentales se han registrado medidas de birrefringencia y dicroísmo eléctricos positivos. Este cambio en el signo habitual del efecto electro-óptico (birrefringencia y dicroísmo eléctricos) del ADN es frecuentemente denominado efecto anómalo.

Porschke⁴ reportó que fragmentos de restricción con longitudes de cadena entre 870 y 3000 Å en presencia de NaCl (intensidades iónicas entre 1 y 11 mM) presentan birrefringencia y dicroísmo eléctricos positivos para intensidades de campo eléctrico bajo. Según los datos experimentales reportados por éste autor se observa que el rango de longitudes de cadena para el cual tiene lugar el efecto anómalo es dependiente de la concentración salina.

Debido a la elevada polarizabilidad eléctrica del polielectrolito (ADN más contraiones) en la dirección de su eje largo, el torque generado por la interacción entre el momento dipolar eléctrico inducido y el campo eléctrico aplicado tiende a orientar a las moléculas en dirección paralela al campo eléctrico. Por este motivo, y porque como hemos mencionado anteriormente las transiciones electrónicas en el ADN ocurren predominantemente en el plano de sus bases, la contribución a la birrefringencia y al dicroísmo eléctricos originadas en la orientación por polarización es negativa y no puede explicar una señal electro-óptica positiva.

La explicación de por qué la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos del ADN invierten su signo esta directamente relacionada con las propiedades hidrodinámicas de moléculas con geometría asimétrica. Si los fragmentos de ADN son suficientemente cortos es adecuado describirlos como un polielectrolito cilíndrico que se polariza por la acción del campo eléctrico aplicado y que tiende a orientarse en dirección paralela mismo. Conforme aumenta la longitud de cadena de los fragmentos de ADN resulta necesario implementar modelos asimétricos que describan adecuadamente la curvatura de la cadena. En el caso de moléculas de forma arbitraria los movimientos de difusión traslacional y rotacional están acoplados⁵, existiendo así un torque debido al movimiento de migración de las moléculas.

Bertolotto⁶ estudió la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos estacionarios de fragmentos de ADN descritos con un modelo de macroión tipo arco en el límite de campos eléctricos de baja intensidad. En su trabajo demostró que el acoplamiento hidrodinámico traslación-

rotación produce una componente positiva en la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos que permite explicar el efecto anómalo.

Porschke y Antosiewicz⁷, estudiaron el efecto del acoplamiento traslación-rotación sobre el dicroísmo eléctrico de fragmentos de ADN tipo arco rígido de 179 pb en un amplio rango de intensidades de campo eléctrico mediante simulación dinámica Browniana. Los resultados obtenidos por estos autores corrobora la existencia de una componente positiva en el efecto electro-óptico debida al acoplamiento hidrodinámico.

Propiedades ópticas. Aspectos relacionados con el tamaño finito de las moléculas.

Actualmente, es habitual utilizar teorías para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos que consideran a las moléculas pequeñas con respecto a la longitud de onda de la luz utilizada para las mediciones. Sin embargo, al aplicar dichas teorías a macromoléculas tal suposición puede no estar plenamente justificada. Por ejemplo, en el caso de fragmentos de ADN las longitudes de cadena pueden ser del orden de la longitud de onda de la luz empleada en las experiencias.

Taylor y Cramer⁸ estudiaron la birrefringencia de flujo de moléculas cuya longitud no es pequeña respecto de la longitud de onda mediante técnicas de dispersión de luz esencialmente descritas por van de Hulst⁹. Su estudio se basa en la aproximación de Rayleigh-Gans cuya aplicabilidad en este problema resulta válida solamente si las moléculas son largas y están muy orientadas. En el caso de la birrefringencia o el dicroísmo eléctricos un alto grado orientacional es alcanzado solamente mediante campos eléctricos de muy alta intensidad.

Don Ridgeway¹⁰ aplicó el método descrito por Taylor y Cramer para describir los transitorios de la birrefringencia eléctrica de soluciones de partículas elipsoidales asimétricas.

Stoylov¹¹ describe una serie de trabajos que no están destinados directamente al estudio de la birrefringencia o el dicroísmo eléctricos, pero que analizan las propiedades ópticas de moléculas mediante técnicas de dispersión de luz en el límite de distintas aproximaciones. Un aspecto común a los tratados basados en técnicas de dispersión de luz es que no incluyen las interacciones intramoleculares.

DeVoe¹² estudió la absorción, refracción y actividad óptica de soluciones diluidas de agregados moleculares y polímeros incluyendo las interacciones ópticas entre las partes de los mismos. La inclusión de las interacciones intramoleculares en su teoría le permitió describir efectos como el hipocromismo de ácidos nucleicos¹³. Self y Moore^{14,15} aplicaron la teoría de DeVoe para estudiar la absorción del ADN en la región infrarroja del espectro.

Purcell y Pennypaker¹⁶ extendieron el trabajo de DeVoe e incluyeron los cambios de fase

de la luz incidente a través de las moléculas, dando origen a un método para estudiar las propiedades ópticas hoy conocido como aproximación de dipolos discretos. Actualmente no existen aplicaciones de éste método a las teorías electro-ópticas, no siendo algunos realizados en la aproximación de DeVoe^{14,15}.

Orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico

El estudio de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN requiere conocer el grado orientacional de las moléculas al aplicar un campo eléctrico sobre la solución. El análisis teórico del proceso orientacional presenta un alto grado de dificultad, razón por la cual es común realizar diversas simplificaciones en los modelos moleculares empleados. Por ejemplo, se implementan modelos según los cuales las moléculas son planas y rígidas. Sin embargo, la mayoría de las moléculas biológicas y polímeros sintéticos son en realidad flexibles. Por lo tanto, a fin de mejorar la aplicabilidad de las técnicas electro-ópticas a esta clase de sistemas y lograr una caracterización más adecuada de sus propiedades físicas, es necesario introducir modelos más complejos que incluyan aspectos como la flexibilidad de las moléculas.

Frente a lo recientemente expuesto, la simulación computacional ofrece una herramienta que permite incluir aquellos aspectos de difícil implementación en los análisis teóricos.

Actualmente, existen algunos trabajos que implementan modelos flexibles utilizando como técnica de estudio la simulación computacional¹⁷. Dado el alto costo computacional que requiere la descripción de sistemas grandes se utilizan métodos de dinámica estocástica y modelos simples constituidos por sistemas de esferas. Por el mismo motivo, en los trabajos reportados en la bibliografía actual la atmósfera iónica del polielectrolito no se considera de manera explícita. Los efectos de la polarización se tienen en cuenta por ejemplo, considerando una distribución asimétrica de la carga eléctrica en las subunidades que conforman el modelo de la cadena polielectrolito¹⁸.

Objetivos específicos de la presente tesis.

- Analizar con métodos teóricos el efecto de la electroforesis junto con el acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación de moléculas rígidas sobre la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos del ADN en presencia de campos eléctricos de intensidad arbitraria.
- Estudiar el efecto sobre las propiedades ópticas del ADN del tamaño finito de las

moléculas con respecto a la longitud de onda.

- Implementar un modelo molecular simple que permita estudiar mediante simulación computacional la orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico.

Estructura de la presente tesis. Actividades realizadas

En la presente tesis se estudian diversos temas de interés para las teorías electro-ópticas de macromoléculas, principalmente en relación con su aplicación al estudio de fragmentos de ADN en solución acuosa. A pesar de la diversidad de temas aquí considerados, así como la diversidad de técnicas aplicadas para su estudio, todos ellos convergen a un mismo propósito que podríamos definir como el objetivo general de este trabajo; a saber, contribuir al desarrollo de las teorías de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos y mejorar su aplicabilidad al estudio de sistemas de interés biológico. Con el propósito de brindar al lector un conocimiento global de los temas tratados y de su vinculación entre sí, describiremos a continuación la estructura de la presente tesis.

- En el capítulo 1 se presentan los aspectos generales de las teorías de uso habitual para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de soluciones. Como se mencionó anteriormente, estas teorías suponen que las dimensiones características de las moléculas en solución son pequeñas en comparación con la longitud de onda de la luz empleada para las mediciones.
- En el capítulo 2 se aplican las teorías presentadas en el capítulo 1 al caso específico de soluciones de ADN. Se utiliza el modelo de macroión tipo arco para representar a los fragmentos de ADN y se describen las propiedades ópticas de este modelo. Se presentan expresiones para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos en términos de la función de distribución orientacional de las moléculas para el modelo implementado.
- En el capítulo 3 se estudia la orientación en el estado estacionario de fragmentos de ADN en presencia de un campo eléctrico de intensidad arbitraria. Al igual que en el capítulo anterior se utiliza el modelo de macroión tipo arco para describir a los fragmentos de ADN. Se caracterizan las propiedades físicas del modelo relevantes para el estudio del proceso orientacional inducido por el campo eléctrico; a saber, sus propiedades eléctricas e hidrodinámicas. La orientación se analiza considerando el torque debido a la polarización iónica y el torque generado por el acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación de las

moléculas. A fin de obtener la función de distribución orientacional de las moléculas en un campo eléctrico se plantea y resuelve la ecuación de Fokker-Planck del sistema. La importancia de este capítulo radica en la implementación de métodos de cálculo numérico que permiten resolver la ecuación de Fokker-Planck para campos eléctricos de intensidad arbitraria.

- En el capítulo 4 se presentan resultados teóricos para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN obtenidos sobre la base teórica y los procedimientos numéricos desarrollados en los capítulos 2 y 3. Se estudian las contribuciones al efecto electro-óptico originadas en los distintos mecanismos de orientación de las moléculas, es decir a las interacción momento dipolar eléctrico inducido-campo eléctrico y al acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación, aunque se realiza especial énfasis en la contribución última.
- En el capítulo 5 se describe el procedimiento experimental para medir el dicroísmo eléctricos de soluciones y se presentan los resultados experimentales obtenidos para muestras de ADN sonificado. Se aplican los desarrollos teóricos descritos en capítulos anteriores para realizar el ajuste de las curvas experimentales de dicroísmo eléctrico reducido en función de la intensidad del campo eléctrico aplicado.
- En el capítulo 6 se estudian las propiedades ópticas de fragmentos de ADN con dimensiones comparables a la longitud de onda de la luz incidente. Los aspectos relacionados con el tamaño finito de las moléculas se incorporan aplicando la aproximación de dipolos discretos para describir las propiedades ópticas de las moléculas. Se incluyen tanto la inhomogeneidad del campo eléctrico de la luz a través de las partículas como las interacciones intramoleculares y se discuten sus efectos sobre las propiedades ópticas intrínsecas de fragmentos de ADN.
- El capítulo 7 se destina a desarrollar un modelo simple para describir a fragmentos de ADN y a su atmósfera iónica, que permita estudiar con simulación computacional la orientación de la cadena polielectrolito en un campo eléctrico. La técnica de simulación elegida, por su costo computacional relativamente bajo, es la simulación dinámica de Langevin. A fin de optimizar los recursos computacionales se implementa un modelo de subunidades esféricas unidas entre sí para describir a los fragmentos de ADN. Se analizan

las características elásticas y eléctricas del modelo y se introduce una función de orientación que se relaciona directamente con la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos.

CAPÍTULO 1

CONSIDERACIONES TEÓRICAS GENERALES SOBRE LA BIRREFRINGENCIA Y EL DICROÍSMO ELÉCTRICOS DE SOLUCIONES

1.1 Introducción

Muchas sustancias líquidas se vuelven birrefringentes y dicroicas al aplicar sobre ellas un campo eléctrico. Esto ocurre por dos motivos. El primero de ellos es que las propiedades ópticas de las moléculas en solución son, en general, no isotrópicas. El segundo motivo es que el campo eléctrico aplicado sobre la solución orienta a las moléculas en el espacio, proceso que lleva a que la anisotropía óptica de las moléculas se manifieste a nivel de la solución. Por el contrario, en ausencia de campo eléctrico las moléculas se encuentran desordenadas debido a la agitación térmica y la solución exhibe propiedades ópticas isotrópicas.

En un experimento de electro-óptica típico se coloca una solución dentro de una celda que contiene dos electrodos planos y paralelos, denominada celda de Kerr, se aplica una diferencia de potencial entre ellos y, a su vez, se hace incidir un haz de luz monocromático, plano-polarizado, que se propaga en dirección perpendicular al campo eléctrico que resulta de la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos. Para medir la birrefringencia eléctrica, el haz de luz incidente se dispone con su plano de polarización formando un ángulo de 45° con la dirección del campo eléctrico aplicado. El haz incidente se descompone entonces en dos haces de luz plano-polarizados según las direcciones paralela y perpendicular al campo eléctrico externo. Las dos componentes del haz se propagan con diferente velocidad de fase debido a que la solución presenta dos índices de refracción diferentes, $n_{//}$ y n_{\perp} según las direcciones paralela y perpendicular al campo eléctrico, respectivamente. La diferencia $\Delta n = n_{//} - n_{\perp}$ se denomina birrefringencia eléctrica de la solución.

Por razones de conveniencia, la dirección del plano de polarización de la luz incidente en una experiencia para medir el dicroísmo eléctrico es diferente de aquel utilizado para medir la

birrefringencia eléctrica. La dirección de plano de polarización más práctica para medir el dichroísmo eléctrico es paralela al campo eléctrico aplicado. No obstante, el dichroísmo eléctrico se define de forma análoga a la birrefringencia eléctrica como $\Delta A = A_{//} - A_{\perp}$, siendo $A_{//}$ y A_{\perp} las absorbancias que presenta la solución según las direcciones paralela y perpendicular al campo eléctrico aplicado, respectivamente.

En este capítulo presentaremos los fundamentos teóricos para la birrefringencia y el dichroísmo eléctricos de soluciones diluidas. Se deducirán expresiones generales, tanto para la birrefringencia como para el dichroísmo eléctrico, que en capítulos posteriores serán aplicadas a soluciones de ADN.

Es conveniente mencionar que el presente marco teórico supone que las dimensiones características de las moléculas son mucho menores que la longitud de onda de la luz que atraviesa la solución. Esta suposición, que es de uso habitual en la bibliografía actual, se mantendrá a lo largo de esta tesis, a excepción del capítulo 6 donde se estudian las consecuencias de eliminar tal simplificación sobre las propiedades ópticas del ADN.

1.2 Sobre las descripciones clásica y cuántica de la interacción de la luz con la materia

Dado que en el presente trabajo se empleará tanto la descripción clásica como cuántica de la interacción de la luz con la materia nos referiremos primeramente y de modo general a las diferencias entre ambas descripciones.

Los tratamientos clásico y cuántico de la interacción de la luz con la materia conducen, hasta cierto punto, a los mismos resultados, pero se atribuyen diferentes interpretaciones al proceso de interacción moléculas-luz y a las propiedades ópticas de las moléculas¹⁹.

En el estudio de la birrefringencia eléctrica es habitual utilizar una descripción en el marco de la mecánica clásica. En esta descripción los electrones oscilan en torno a sus posiciones de equilibrio bajo la acción de diferentes fuerzas, las fuerzas de restitución que lo ligan al núcleo, la fuerza periódica del campo eléctrico de la luz incidente y, dependiendo del grado de descripción, las fuerzas de amortiguamiento que conducen a la atenuación de la radiación. En tal descripción, cada molécula se caracteriza mediante su tensor polarizabilidad óptica, definido éste a partir de una relación de proporcionalidad entre el momento dipolar eléctrico inducido en la molécula y el campo eléctrico que sobre ella actúa. Si nos restringimos a radiación cuya frecuencia no corresponde al espectro de absorción de las moléculas el tensor polarizabilidad óptica se puede representar adecuadamente mediante una cantidad real.

Por otro lado, al estudiar el dicroísmo eléctrico es habitual emplear una descripción en el marco de la mecánica cuántica. Desde este punto de vista, la absorción ocurre porque la radiación induce transiciones electrónicas en las moléculas hacia estados excitados de mayor energía. En esta descripción la propiedad óptica fundamental que caracteriza a las moléculas es el vector momento de transición de cada uno de sus grupos cromóforos, el cual se define como el valor esperado del operador momento dipolar eléctrico calculado entre los estados en que la transición ocurre.

En este trabajo abordaremos, tal como es habitual, el punto de vista clásico para el estudio de la birrefringencia y el punto de vista cuántico para el estudio del dicroísmo. Sin embargo, hacemos la salvedad de que en el capítulo 6, donde analizaremos las propiedades ópticas de partículas con dimensiones comparables a la longitud de onda, emplearemos la descripción clásica para estudiar tanto la birrefringencia como la absorción de soluciones.

1.3 Birrefringencia eléctrica de soluciones

Consideremos una solución de moléculas orientadas bajo la acción de un campo eléctrico externo. La solución se comporta como un cristal uniaxial con su eje óptico paralelo al campo eléctrico aplicado. Supongamos que sobre la solución incide un haz de luz plano-polarizado, de frecuencia óptica, que se propaga en dirección perpendicular al eje óptico. Consideramos que a la frecuencia de la radiación incidente la sustancia es transparente por lo que el presente desarrollo es aplicable fuera de las bandas de absorción de las moléculas. Sea XYZ el sistema de coordenadas del laboratorio (SL) elegido con sus ejes X y Z coincidentes con la dirección de propagación del haz de luz y del campo eléctrico externo, respectivamente. Con esta elección del SL la birrefringencia eléctrica viene dada por la relación

$$\Delta n = n_z - n_y \quad (1.1)$$

donde n_y y n_z son los índices de refracción que presenta la solución para luz con su plano de polarización según las direcciones Y y Z, respectivamente.

En respuesta al campo eléctrico \mathbf{E} de la luz incidente las moléculas se polarizan. El vector polarización \mathbf{P} se relaciona con el campo eléctrico de la luz mediante la relación $\mathbf{P} = \epsilon_o [\overline{\chi}] \mathbf{E}$, donde ϵ_o es la permitividad del vacío y $[\overline{\chi}]^*$ es el tensor susceptibilidad eléctrica de la solución. Dada nuestra elección de la dirección del eje Z, la susceptibilidad eléctrica en el SL

* Emplearemos la barra superior para referirnos a la representación de un tensor con respecto al sistema de coordenadas del laboratorio.

está representada por tensor diagonal cuyos elementos principales determinan los índices de refracción n_y y n_z de la solución de la siguiente manera

$$n_k^2 = 1 + \bar{\chi}_{kk} \quad k = y, z \quad (1.2)$$

donde hemos utilizado las conocidas relaciones $n_k^2 = \bar{\kappa}_{kk}$ y $\bar{\kappa}_{kk} = 1 + \bar{\chi}_{kk}$, siendo $\bar{\kappa}_{kk}$ ($k = y, z$) las componentes diagonales del tensor permitividad relativa de la solución.

El vector polarización se define como el momento dipolar eléctrico medio de las moléculas por unidad de volumen. Esta definición establece un nexo entre las propiedades macroscópicas de la solución y las propiedades microscópicas de las moléculas individuales. Sea N el número de partículas por unidad de volumen y $[\bar{\alpha}^o]$ el tensor polarizabilidad óptica de una molécula en el SL. Aplicando la aproximación de Lorentz-Lorenz²⁰ para el campo eléctrico local el vector polarización resulta

$$\mathbf{P} = N \langle [\bar{\alpha}^o] \rangle \left(\mathbf{E} + \frac{1}{3\epsilon_o} \mathbf{P} \right) \quad (1.3)$$

donde los corchetes angulares significan promedio estadístico sobre todas las orientaciones posibles.

Al tratar con soluciones debemos considerar las contribuciones del soluto y del solvente a la polarización del sistema. Si nos referimos mediante $\langle [\bar{\alpha}^o] \rangle$ a la polarizabilidad óptica promedio de una molécula del soluto y con $\langle [\bar{\alpha}_s^o] \rangle = \langle \bar{\alpha}_s^o \rangle [I]$, siendo $[I]$ la matriz identidad, a la polarizabilidad óptica promedio de una molécula del solvente, que suponemos isotrópico y transparente, podemos escribir la polarización de la solución de la siguiente manera

$$\mathbf{P} = \left[N_s \langle \bar{\alpha}_s^o \rangle [I] + N \langle [\bar{\alpha}^o] \rangle \right] \left(\mathbf{E} + \frac{1}{3\epsilon_o} \mathbf{P} \right) \quad (1.4)$$

donde N y N_s representan el número de partículas del soluto y del solvente, respectivamente, por unidad de volumen.

Resolviendo la última ecuación para \mathbf{P} y utilizando las expresiones $\mathbf{P} = \epsilon_o [\bar{\chi}] \mathbf{E}$ y $n_k^2 = 1 + \bar{\chi}_{kk}$ se obtiene

$$\frac{n_k^2 - 1}{n_k^2 + 2} = \frac{1}{3\epsilon_o} \left(N_s \langle \bar{\alpha}_s^o \rangle + N \langle [\bar{\alpha}^o] \rangle_{kk} \right) \quad (1.5)$$

Restando las expresiones que surgen de aplicar la Ec.(1.5) a las direcciones Z e Y resulta

$$\frac{n_z^2 - 1}{n_z^2 + 2} - \frac{n_y^2 - 1}{n_y^2 + 2} = \frac{N}{3\varepsilon_o} \left(\langle [\bar{\alpha}^o] \rangle_{zz} - \langle [\bar{\alpha}^o] \rangle_{yy} \right) \quad (1.6)$$

A partir de la Ec.(1.6) y utilizando la aproximación $(n_z^2 + 2)(n_y^2 + 2) \cong (n_s^2 + 2)^2$, válida para soluciones diluidas, se obtiene la siguiente expresión para la birrefringencia eléctrica

$$\Delta n = \frac{N}{2\varepsilon_o n_s} \left(\langle [\bar{\alpha}^o] \rangle_{zz} - \langle [\bar{\alpha}^o] \rangle_{yy} \right) \quad (1.7)$$

En la deducción de la última ecuación se ha realizado la aproximación de uso habitual $(n_s^2 + 2)^2 / 9n_s \cong 1/n_s$.

1.4 Dicroísmo eléctrico de soluciones

A efectos de estudiar el dicroísmo eléctrico consideremos la situación descrita en la sección 1.3, donde un haz de luz plano-polarizado incide sobre una solución de moléculas orientadas por la presencia de un campo eléctrico externo. No obstante, a diferencia de lo expuesto en aquella sección, en ésta consideraremos que la frecuencia de la luz incidente se encuentra dentro del rango de frecuencias donde la solución absorbe. Manteniendo la elección previamente realizada del SL, el dicroísmo eléctrico de la solución viene dado por

$$\Delta A = A_z - A_y \quad (1.8)$$

donde A_y y A_z son las absorbancias que presenta la solución para luz con su plano de polarización según las direcciones Y y Z, respectivamente.

La absorbancia A_k ($k = y, z$) se define a partir de las intensidades de luz incidente $I_{o,k}$ y transmitida I_k de la siguiente manera

$$A_k = \log \left(\frac{I_{o,k}}{I_k} \right) \quad (1.9)$$

El subíndice k presente en las intensidades $I_{o,k}$ e I_k indican que las mismas corresponden al caso en que la luz incidente está plano-polarizada según la dirección k . Al igual que para la absorbancia A_k , este subíndice puede representar las direcciones Y o Z. De aquí en adelante, mantendremos esta notación para explicitar, en aquellos casos que resulten necesarios, la dirección de polarización de la luz incidente.

Las intensidades $I_{o,k}$ e I_k se relacionan entre sí a través de la ley de Lambert-Beer²¹

$$I_k = I_{o,k} 10^{-\gamma_k l C} \quad (1.10)$$

donde γ_k es el coeficiente de extinción molar en metros cuadrado por mol, l la longitud de camino óptico en metros y C la concentración en moles por metro cúbico.

Combinando las Ecs.(1.9) y (1.10) se encuentra que la absorbancia y el coeficiente de extinción satisfacen la siguiente relación

$$A_k = \gamma_k l C \quad (1.11)$$

De esta manera, la absorción de la solución depende de la concentración de moléculas, de la longitud de camino óptico y de las propiedades físicas de las moléculas a través del coeficiente de extinción de las mismas.

Cuando el haz de luz atraviesa una capa de espesor δx la intensidad de luz perdida es proporcional a la energía absorbida promedio por molécula por segundo W_k ²²

$$\delta I_k = \delta N (-W_k) \quad (1.12)$$

donde δN es el número de moléculas en la capa por unidad de área perpendicular al haz.

Si expresamos δN en función de la concentración C la Ec.(1.12) se puede expresar en la forma

$$\delta I_k = C N_A \delta x (-W_k) \quad (1.13)$$

Por otro lado, expresando la ley de Lambert-Beer en forma diferencial el cambio en la intensidad $\delta I_k = I_k - I_{o,k}$ del haz de luz al atravesar un espesor δx de la solución satisface la relación

$$\frac{\delta I_k}{I_{o,k}} = -2,3 \gamma_k \delta x C \quad (1.14)$$

Combinando las dos últimas ecuaciones se obtiene la siguiente expresión para el coeficiente de extinción

$$\gamma_k = \frac{N_A W_k}{2,3 I_{o,k}} \quad (1.15)$$

La energía absorbida W_k dependerá de la capacidad de la radiación de inducir transiciones electrónicas en las moléculas. Schellman²² determinó sobre la base de la teoría cuántica de la

absorción que la energía absorbida promedio por unidad de tiempo de un sistema de monómeros con orientación fija, para radiación incidente de frecuencia ω , viene dada por

$$W_k = \frac{\pi\omega\rho(\omega)}{2\hbar} |\mathbf{p} \cdot \mathbf{E}_k|^2 = g(\omega) |\mathbf{p} \cdot \mathbf{E}_k|^2 \quad (1.16)$$

donde \mathbf{E}_k es el campo eléctrico de la luz, $\rho(\omega)$ es un factor que tiene la forma de la banda de absorción para la transición electrónica correspondiente al momento de transición \mathbf{p} . En el lado derecho de la Ec.(1.16) la dependencia con la frecuencia y las constantes han sido combinadas e incluidas en el factor $g(\omega)$.

Este resultado para sistemas de monómeros puede extenderse a sistemas de polímeros con orientación fija. Si suponemos que la interacción entre los diferentes grupos cromóforos (monómeros) en el polímero es suficientemente débil como para despreciarse, la energía absorbida W_k puede expresarse de la siguiente manera

$$W_k = g(\omega) \sum_i |\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{E}_k|^2 \quad (1.17)$$

donde la suma se extiende sobre todos los grupos cromóforos en la molécula.

Reemplazando la Ec.(1.17) en la Ec.(1.15) el coeficiente de extinción para el sistema de polímeros con orientación fija resulta

$$\gamma_k = \frac{N_A}{2,3J_{o,k}} g(\omega) \sum_i |\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{e}_k|^2 \quad (1.18)$$

Para estudiar el dicroísmo eléctrico debemos tener en cuenta que las moléculas en solución no están orientadas en una dirección fija del espacio. Por lo tanto, las Ecs.(1.17) y (1.18) deben promediarse sobre todas las orientaciones posibles. Para realizar el promedio es necesario conocer la función de distribución orientacional de las moléculas al aplicar el campo eléctrico externo.

A veces resulta conveniente trabajar en términos del dicroísmo eléctrico reducido, definido como la razón entre el dicroísmo eléctrico y la absorbancia de la solución en ausencia de campo eléctrico externo. La razón de ello es que, como demostraremos en el capítulo siguiente, el dicroísmo eléctrico reducido resulta independiente de la magnitud del momento de transición. Para determinar el dicroísmo eléctrico reducido combinamos las Ecs.(1.8), (1.11) y (1.15). De esta manera se obtiene

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\langle W_z \rangle - \langle W_y \rangle}{\langle W \rangle} \quad (1.19)$$

donde los corchetes angulares presentes en la Ec.(1.19) significan promedio estadístico sobre todas las orientaciones. W_z y W_y deben promediarse teniendo en cuenta que hay un campo eléctrico aplicado mientras que W debe promediarse para orientación aleatoria. En éste último caso es indistinto considerar luz linealmente polarizada según la dirección paralela o perpendicular al campo eléctrico aplicado, por lo que no ha sido incluido ningún subíndice z o y en la Ec.(1.19).

BIRREFRINGENCIA Y DICROÍSMO ELÉCTRICOS DE SOLUCIONES DE ADN

2.1 Introducción

En este capítulo aplicaremos los desarrollos teóricos del capítulo anterior a soluciones de ADN. Tal aplicación requiere la implementación de un modelo molecular apropiado para nuestro problema. Dado que el ADN nativo tiene una estructura de *random coil* con grandes dimensiones su estudio mediante técnicas electro-ópticas requiere la eventual ruptura de su forma natural en fragmentos relativamente pequeños que permitan la implementación de modelos moleculares simples en el análisis teórico. Experimentalmente, la ruptura del *random coil* se puede realizar mediante técnicas de sonicado, entre otras. Las soluciones de ADN sonicado presentan un alto grado de polidispersión. En el análisis teórico se deberá utilizar un modelo cuya geometría sea representativa de los fragmentos de ADN que se dispone para la experiencia. Si los fragmentos de ADN son suficientemente cortos, de manera que se pueda despreciar su curvatura, es posible implementar el modelo de macroión tipo varilla recta, es decir un polielectrolito cilíndrico. Para fuerza iónica baja la máxima longitud de cadena para la cual se puede implementar este modelo es de hasta 800 \AA , disminuyendo este límite conforme aumenta la fuerza iónica²³. Por el contrario, si los fragmentos de ADN no son suficientemente cortos deben utilizarse modelos sin simetría cilíndrica. Si la longitud de cadena de los fragmentos no es mucho mayor que la longitud de persistencia se pueden emplear modelos asimétricos relativamente simples, como el de macroión tipo arco. Como veremos en el capítulo 3, al emplear este modelo existe un acoplamiento hidrodinámico entre los movimientos de traslación y rotación de las moléculas. En este capítulo describiremos a los fragmentos de ADN con el modelo de macroión tipo arco cuyas propiedades geométricas y ópticas se describen en la sección 2.2. Se deducirán expresiones para la birrefringencia y el dicroísmo eléctrico desarrolladas sobre la base de este modelo. De esta manera, este capítulo

sienta una base para el posterior desarrollo de una gran parte de la presente tesis.

2.2 Modelo de macroión tipo arco (MTA)

El modelo de macroión tipo arco (MTA) es un modelo molecular caracterizado desde un punto de vista geométrico por su longitud de arco de circunferencia L , su radio de curvatura R y su ángulo de *bending* $2\gamma_0$. Elegimos los ejes $X'Y'Z'$ del sistema de coordenadas de cuerpo (SC) de manera que el MTA se dispone en el plano $X'Z'$ con su centro de curvatura, así como el de masa, sobre el eje X' (Fig. 2.1). El origen O' del SC coincide con el centro de masa del macroión.

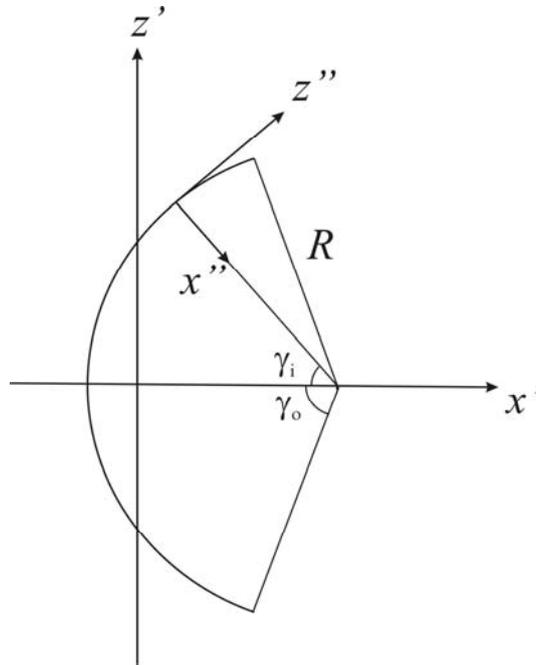


Fig. 2.1 Modelo de macroión tipo arco

A efectos de estudiar la birrefringencia eléctrica las propiedades ópticas del MTA se caracterizan mediante el tensor polarizabilidad óptica que en SC viene dado por

$$[\alpha^o] = \begin{bmatrix} \alpha_{x'x'}^o & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{y'y'}^o & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{z'z'}^o \end{bmatrix} \quad (2.1)$$

Si la solución no absorbe a la frecuencia de la radiación incidente los elementos del tensor polarizabilidad óptica se pueden representar adecuadamente mediante cantidades reales.

Los elementos del tensor polarizabilidad óptica de la molécula se pueden obtener sumando las contribuciones de cada elemento de arco en el MTA. El procedimiento es semejante al utilizado por Bertolotto²⁴ para moléculas tipo varilla quebrada. De esta manera resulta

$$\alpha_{x'x'}^o = R[\gamma_o(v_{x''} + v_{z''}) + (v_{x''} - v_{z''})\cos\gamma_o \operatorname{sen}\gamma_o] \quad (2.2)$$

$$\alpha_{y'y'}^o = 2R\cos\gamma_o v_{x''} \quad (2.3)$$

$$\alpha_{z'z'}^o = R[\gamma_o(v_{x''} + v_{z''}) - (v_{x''} - v_{z''})\cos\gamma_o \operatorname{sen}\gamma_o] \quad (2.4)$$

donde $v_{x''}$ y $v_{z''}$ son los elementos principales del tensor polarizabilidad óptica por unidad de longitud de un elemento de arco dl en un sistema de coordenadas $X''Y''Z''$ con su eje Z'' tangente al elemento de arco (Fig. 2.1). Dada la simetría que presentan las propiedades ópticas en el plano de las bases los elementos $v_{x''}$ y $v_{y''}$ son iguales.

Por otro lado, a efectos de estudiar el dicroísmo eléctrico las propiedades ópticas del MTA se describen mediante el momento de transición \mathbf{p} de cada grupo cromóforo* en la molécula. Para fragmentos de ADN en presencia de radiación ultravioleta la dirección del momento de transición de un grupo cromóforo se encuentra en el plano de las bases del mismo.

2.3 Birrefringencia eléctrica del ADN empleando el modelo de macroión tipo arco (MTA)

A fin de obtener una expresión para la birrefringencia eléctrica del ADN utilizando el modelo MTA primero se transforma el tensor polarizabilidad óptica dado por la Ec.(2.1) al SL de la siguiente manera

$$[\bar{\alpha}^o] = [R]^{-1}[\alpha^o][R] \quad (2.5)$$

donde $[R]^{-1}$ es la matriz de transformación de Euler del SC al SL dada por

$$[R]^{-1} = \begin{bmatrix} \cos\psi \cos\phi - \cos\theta \operatorname{sen}\phi \operatorname{sen}\psi & -\operatorname{sen}\psi \cos\phi - \cos\theta \operatorname{sen}\phi \cos\psi & \operatorname{sen}\theta \operatorname{sen}\phi \\ \cos\psi \operatorname{sen}\phi + \cos\theta \cos\phi \operatorname{sen}\psi & -\operatorname{sen}\psi \operatorname{sen}\phi + \cos\theta \cos\phi \cos\psi & -\operatorname{sen}\theta \cos\phi \\ \operatorname{sen}\theta \operatorname{sen}\phi & \operatorname{sen}\theta \cos\psi & \cos\theta \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

Reemplazando el resultado obtenido para $[\bar{\alpha}^o]$ en la expresión general para la birrefringencia dada por la Ec.(1.7) se puede demostrar que para el MTA la birrefringencia eléctrica viene dada por la siguiente expresión

* Consideraremos que cada unidad monómera de la cadena de ADN constituye un grupo cromóforo.

$$\Delta n = \frac{N \pi}{\varepsilon_o n_s} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \left[\frac{A_0}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) - \frac{3}{4} B_0 (1 - \cos^2 \theta) (2 \sin^2 \psi - 1) \right] f(\theta, \psi) \sin \theta d\theta d\psi \quad (2.7)$$

con

$$A_0 = \frac{1}{2} R \Delta (\gamma_o + 3 \cos \gamma_o \sin \gamma_o) \quad (2.8)$$

$$B_0 = -R \Delta (\gamma_o - \cos \gamma_o \sin \gamma_o) \quad (2.9)$$

$$\Delta = \nu_{z''} - \nu_{x''} \quad (2.10)$$

En la Ec.(2.7) $f(\theta, \psi)$ es la función de distribución orientacional (o densidad de probabilidad) y las integrales representan el promedio estadístico sobre las diferentes orientaciones posibles de una molécula en los ángulos θ y ψ . El promedio en el ángulo ϕ ya fue realizado aprovechando la independencia de la función de distribución orientacional con respecto a dicha variable. La razón por la cual la probabilidad de encontrar una molécula con diferentes orientaciones en ϕ es constante radica en que el campo eléctrico externo induce simetría cilíndrica en el sistema. Dado que no resulta necesario no se brindarán más detalles sobre función de distribución sino hasta el capítulo 3, donde se presentarán los desarrollos teóricos y los procedimientos numéricos para el cálculo de la misma.

2.4 Dicroísmo eléctrico reducido del ADN empleando el modelo de macroión tipo arco (MTA)

En esta sección deduciremos una expresión para el dicroísmo eléctrico reducido del ADN utilizando el modelo MTA. Restringiremos nuestro estudio al caso de radiación ultravioleta. En este rango del espectro la longitud de onda de máxima absorción del ADN es de 260 nm. La absorción ocurre debido a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ inducidas por la radiación en los anillos heterocíclicos de las bases purinas y pirimidinas¹⁹. Por lo tanto, el momento de transición inducido en cada grupo cromóforo, en este caso un par de bases, tiene componentes no nulas en las direcciones perpendiculares al eje de la hélice del ADN.

Consideremos un grupo cromóforo arbitrario en la molécula al que nos referiremos con el índice i . Sea S'' un sistema de coordenadas $X''Y''Z''$ con su eje Z'' coincidente con la recta tangente al arco en el punto donde se localiza el centro del grupo cromóforo i (Fig. 2.1). El momento de transición \mathbf{p}_i del grupo cromóforo en cuestión en el sistema S'' viene dado por

$$\mathbf{p}_i = (p \cos \beta \quad p \sin \beta \quad 0) \quad (2.12)$$

donde β es el ángulo que proyecta \mathbf{p}_i sobre los ejes X'' e Y'' . La componente de \mathbf{p}_i según Z'' es cero porque las transiciones electrónicas se producen en el plano de las bases del ADN.

Para referir el momento de transición \mathbf{p}_i al sistema de coordenadas del cuerpo se realiza una transformación de rotación de un ángulo γ_i alrededor del eje Y' . La matriz de rotación tiene los siguientes elementos no nulos: $a_{11} = a_{33} = \cos \gamma_i$, $a_{22} = 1$ y $a_{13} = -a_{31} = \sin \gamma_i$. En el sistema del cuerpo el momento de transición del grupo cromóforo i resulta

$$\mathbf{p}_i = (p \cos \beta \sin \gamma_i \quad p \sin \beta \quad -p \cos \beta \sin \gamma_i) \quad (2.13)$$

A efectos de calcular el dichroísmo eléctrico primero se transforma la Ec.(2.13) al SL con la matriz de transformación de Euler dada por la Ec.(2.6). Una vez expresado \mathbf{p}_i en el SL se lo reemplaza en la Ec.(1.17) para obtener las energías W , W_y y W_z . El resultado así obtenido es promediado en el ángulo β con densidad de probabilidad igual $1/2\pi$ para considerar que los momentos de transición se encuentran aleatoriamente orientados en el plano de bases. Para desarrollar las sumatorias presentes en las Ec.(1.17) el ángulo γ_i se expresa como $\gamma_i = -\gamma_0 + \Delta\gamma(i-1/2)$, con $\Delta\gamma = 2\gamma_0 / N_C$ y N_C el número de grupos cromóforos en la molécula. Finalmente, las expresiones obtenidas para W , W_y y W_z se reemplazan en la Ec.(1.19). De esta manera el dichroísmo eléctrico reducido resulta

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{3\pi}{16\gamma_o} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} [(-\gamma_o - 3F_o)(1 + 3\cos 2\theta) - 6(-\gamma_o + F_o)\cos 2\psi \sin^2 \theta] f(\theta, \psi) \sin \theta d\theta d\psi \quad (2.14)$$

donde $F_o = \cos \gamma_o \sin \gamma_o$.

En la Ec.(2.14), al igual que se hizo para la birrefringencia eléctrica, el promedio estadístico en el ángulo ϕ ya ha sido realizado.

ORIENTACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN UN CAMPO ELÉCTRICO

3.1 Introducción

Las teorías electro-ópticas, tales como las teorías para la birrefringencia o el dicroísmo eléctricos, requieren conocer la función de distribución orientacional de las moléculas en presencia de un campo eléctrico externo. En el capítulo 1 se trataron con tales teorías para soluciones diluidas en general y en el capítulo 2 se dedujeron expresiones para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de soluciones diluidas de fragmentos de ADN empleando el modelo MTA. Los resultados se presentaron sin explicitar la función de distribución orientacional, la que es necesaria para realizar los promedios estadísticos sobre las distintas orientaciones posibles de las moléculas al aplicar el campo eléctrico. El objetivo de este capítulo es presentar el marco teórico y los procedimientos numéricos que permiten calcular la función de distribución orientacional.

Para macromoléculas que pueden ser descriptas mediante geometrías simples, tales como cilindros y elipsoides, el estudio del proceso orientacional es relativamente simple. En estos casos las moléculas se orientan debido a la interacción entre sus propiedades eléctricas (momento dipolar eléctrico permanente y/o inducido) con el campo eléctrico aplicado y, una vez alcanzado el estado estacionario, las orientaciones pueden describirse con la función de distribución de Boltzmann dada por

$$f(\phi, \theta, \psi) = \frac{\exp(-W/k_B T)}{\int \exp(-W/k_B T) \sin\theta d\phi d\theta d\psi} \quad (3.1)$$

donde W es la energía de interacción entre las moléculas y el campo eléctrico, k_B la constante de Boltzmann y θ , ϕ y ψ los tres ángulos de Euler que especifican la orientación de la molécula respecto del SL. La energía W es la suma de las energías W_i y W_p , donde la

primera es la energía de interacción entre el campo eléctrico y el momento dipolar eléctrico inducido, y la segunda es la energía de interacción entre el campo eléctrico y el momento dipolar eléctrico permanente. Estas energías vienen dadas por

$$W_p = -\boldsymbol{\mu}_p \cdot \mathbf{E} \quad (3.2)$$

$$W_i = -(1/2)\mathbf{E} \cdot [\bar{\alpha}^E] \cdot \mathbf{E} \quad (3.3)$$

donde $\boldsymbol{\mu}_p$ es el momento dipolar eléctrico permanente y $[\bar{\alpha}^E]$ el tensor polarizabilidad eléctrica.

Para partículas con forma asimétrica el análisis de la orientación es más complejo debido al acoplamiento hidrodinámico entre sus movimientos de traslación y rotación. Tal acoplamiento para partículas rígidas de forma arbitraria inmersas en un fluido a bajo número de Reynolds ha sido descrito por Brenner⁵ hace varios años. No obstante, la inclusión del acoplamiento hidrodinámico en las teorías electro-ópticas es relativamente reciente^{6,7,25}. Como el torque generado por el acoplamiento hidrodinámico es disipativo la función de distribución no es Boltzmanniana y debe calcularse mediante la ecuación de Fokker-Planck del sistema. La inclusión del acoplamiento hidrodinámico resulta determinante para explicar porqué la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN de longitudes relativamente grandes invierten su signo negativo habitual a campo eléctrico bajo.

Actualmente, la orientación de moléculas tipo MTA cargados y polarizables en un campo eléctrico ha sido estudiada por métodos de simulación computacional⁷ y por métodos teóricos que permiten obtener expresiones analíticas aproximadas para la función de distribución orientacional validas en el límite de campos eléctricos de baja intensidad⁶.

La importancia del presente capítulo es que se aplican métodos teóricos en combinación con procedimientos de cálculo numérico que permiten calcular la función de distribución orientacional eliminando la restricción de campos eléctricos débiles.

3.2 Hidrodinámica de partículas rígidas de forma arbitraria

3.2.1 Generalidades

Cuando una partícula se desplaza en un fluido sobre ella actúa una resistencia hidrodinámica debido a su interacción con las moléculas del fluido. En el caso de partículas rígidas con cierta clase de simetría, tales como esferas, elipsoides y cuerpos de revolución, la resistencia hidrodinámica se manifiesta mediante la presencia de una fuerza y un torque

hidrodinámicos que actúan sobre la partícula de manera independiente conforme ésta se traslada o rota. En tales casos de simetría la difusión rotacional de las moléculas dependerá de la resistencia hidrodinámica rotacional en el fluido, siendo ésta última independiente del movimiento de migración de las moléculas. De la misma manera, la difusión traslacional no estará correlacionada con la difusión rotacional. Sin embargo, en el caso más general donde las partículas carecen de estas propiedades de simetría existe un acoplamiento entre los movimientos de traslación y rotación de las moléculas que se origina por la fricción con el medio.

Brenner⁵ demostró que la resistencia hidrodinámica que actúa sobre una partícula rígida de forma arbitraria inmersa en un fluido a bajo número de Reynolds puede caracterizarse por los siguientes tres elementos: un tensor de fricción traslacional $[K]$, un tensor de fricción rotacional $[\Theta^0]$ y un tensor de fricción de acoplamiento traslación-rotación $[C^0]$. En función de estos tres elementos la fuerza y el torque hidrodinámicos sobre la partícula vienen dados por

$$\mathbf{F} = -[K]\mathbf{v} - [C^0]^t \boldsymbol{\omega} \quad (3.4)$$

$$\mathbf{T} = -[C^0]\mathbf{v} - [\Theta^0]\boldsymbol{\omega} \quad (3.5)$$

donde \mathbf{v} y $\boldsymbol{\omega}$ son la velocidad lineal y la velocidad angular de la partícula, respectivamente. El supraíndice cero, presente en algunos de los tensores de fricción, refleja la dependencia de los mismos con el origen de coordenadas.

A partir de $[K]$, $[\Theta^0]$ y $[C^0]$ se define el gran tensor de fricción de la siguiente manera

$$[\Xi] = \begin{bmatrix} [K] & [C^0]^t \\ [C^0] & [\Theta^0] \end{bmatrix} \quad (3.6)$$

El gran tensor de difusión se relaciona con el gran tensor de fricción mediante la ley de Stokes-Einstein generalizada⁵

$$[D] = kT [\Xi]^{-1} \quad (3.7)$$

$$[D] = \begin{bmatrix} [D_T^0] & [D_C^0]^t \\ [D_C^0] & [D_R] \end{bmatrix} \quad (3.8)$$

donde $[D_T^0]$ es el tensor de difusión traslacional, $[D_R]$ es el tensor de difusión rotacional y $[D_C^0]$ es el tensor de difusión de acoplamiento traslación-rotación.

3.2.2 Propiedades de los tensores de fricción

A continuación enunciaremos algunas propiedades de los tensores de fricción deducidas por Brenner²⁶:

$[K]$ es un tensor simétrico covariante de rango dos determinado por 6 elementos independientes, depende de la geometría de la partícula y es independiente del origen de coordenadas.

$[\Theta^o]$ es un tensor simétrico covariante de rango dos determinado por 6 elementos independientes, depende de la geometría de la partícula y de la localización del origen de coordenadas.

$[C^o]$ es un tensor covariante de rango dos que en general no es simétrico, por lo que, en principio, está determinado por 9 elementos independientes, y depende tanto de la geometría de la partícula como de la localización del origen de coordenadas.

En vista de lo anterior, es necesario determinar veintiún elementos escalares independientes para caracterizar completamente la resistencia hidrodinámica que actúa sobre una partícula rígida de forma arbitraria inmersa en un fluido a bajo número de Reynolds. Sin embargo, en algunos casos este número de elementos independientes puede disminuir debido a las propiedades de simetría de las moléculas. En particular, para moléculas con dos planos de simetría, como es el caso del MTA, se puede demostrar en base a la invariancia ante transformaciones por reflexión²⁶, que el número de elementos independientes necesarios para caracterizar los tensores de fricción son: tres para el tensor de fricción traslacional, tres para el tensor de fricción rotacional y dos para el tensor de fricción de acoplamiento.

3.2.3 Propiedades de los tensores de difusión

Los tensores de difusión traslacional, rotacional y de acoplamiento tienen las mismas propiedades de simetría que los correspondientes tensores de fricción. No obstante, existen diferencias respecto a la dependencia con el origen de coordenadas. En términos de las propiedades difusivas tal dependencia se manifiesta en el tensor de difusión traslacional y en el tensor de acoplamiento. Por otro lado, se debe destacar que los tensores de difusión son tensores contravariantes de rango dos.

3.3 Propiedades eléctricas, ópticas e hidrodinámicas del modelo de macroión tipo arco (MTA) y sistemas de coordenadas

3.3.1 Propiedades físicas

El MTA se dispone en el plano $X'Z'$ del sistema de coordenadas del cuerpo como se precisó en la sección 2.2. En esa misma sección ya se describieron las propiedades geométricas y ópticas del MTA. En la sección presente se describirán las propiedades físicas de interés para el estudio de la orientación de las moléculas debido al campo eléctrico externo.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas del MTA incluyen su masa total m , distribuida uniformemente a lo largo de la molécula, y su tensor de inercia $[I^0]$, con sus elementos principales I_{ii} , siendo $i = X', Y', Z'$. El supraíndice cero denota la posición del origen del sistema de coordenadas del cuerpo, en este caso elegido como el centro de masa.

Propiedades eléctricas

Las propiedades eléctricas incluyen la carga eléctrica q distribuida uniformemente a lo largo de toda la molécula y el tensor polarizabilidad eléctrica $[\alpha^E]$. Empleamos aquí el modelo para la polarizabilidad eléctrica desarrollado por Bertolotto et al.²⁷ en base al cual los elementos principales de $[\alpha^E]$ resultan

$$\alpha_{x'x'}^E = 2KR^2 \left[1 - \cos\left(\frac{S_0}{2R}\right) \right]^2 + \frac{1}{2}KaR \left[\sin\left(\frac{S_0}{R}\right) + \frac{S_0}{R} \right] \quad (3.9)$$

$$\alpha_{y'y'}^E = KS_0a \quad (3.10)$$

$$\alpha_{z'z'}^E = 4KR^2 \sin^2\left(\frac{S_0}{2R}\right) + \frac{1}{2}KaR \left[\frac{S_0}{R} - \sin\left(\frac{S_0}{R}\right) \right] \quad (3.11)$$

donde K es una constante de polarizabilidad eléctrica y a la longitud a través de la cual los contraiones ligados se pueden desplazar en la dirección perpendicular al arco en cualquier punto del MTA.

Propiedades hidrodinámicas

Las propiedades hidrodinámicas incluyen el tensor de fricción traslacional $[K]$ con elementos principales $k_{x'x'}$, $k_{y'y'}$ y $k_{z'z'}$, el tensor de fricción rotacional $[\Theta^O]$ con elementos principales $\theta_{\alpha\alpha}$, $\theta_{\beta\beta}$ y $\theta_{\gamma\gamma}^*$, y el tensor de fricción de acoplamiento traslación-rotación $[C^O]$, con elementos no nulos $c_{\beta z'}$ y $c_{\gamma y'}$.

Las propiedades hidrodinámicas se pueden describir también en términos de los elementos del gran tensor de difusión que se relaciona con el gran tensor de fricción mediante la ley de Stokes-Einstein generalizada dada por la Ec.(3.7). El gran tensor de difusión se compone de los siguientes bloques: el tensor de difusión traslacional $[D_T^O]$ con elementos principales $D_{x'x'}$, $D_{y'y'}$ y $D_{z'z'}$, el tensor de difusión rotacional $[D_R]$ con elementos principales $D_{\alpha\alpha}$, $D_{\beta\beta}$ y $D_{\gamma\gamma}$, y el tensor de difusión de acoplamiento traslación-rotación $[D_C^O]$ con elementos no nulos $D_{\beta z'}$ y $D_{\gamma y'}$.

3.3.2 Sistemas de coordenadas

Sea $O'X'Y'Z'$ el sistema de ejes del cuerpo (SC) y $OXYZ$ el sistema de ejes de laboratorio (SL) como se definieron anteriormente. La posición y orientación del SC con respecto al SL se determinan por las coordenadas de posición x, y, z del origen O' en el SL y por los tres ángulos de Euler que determinan la orientación de los ejes $X'Y'Z'$ respecto de los ejes XYZ . Además del SC y el SL consideraremos el sistema de coordenadas locales (SLOC) definido a continuación. Sea $d\mathbf{R}$ el cambio infinitesimal en la posición del origen O' durante un intervalo de tiempo pequeño dt respecto del SL. Las componentes de $d\mathbf{R}$ según las direcciones instantáneas X', Y', Z' vienen dadas por dx', dy', dz' , respectivamente. El movimiento general incluye también un movimiento de rotación que puede representarse mediante un vector de rotación infinitesimal $d\Phi$ con componentes $d\alpha, d\beta, d\gamma$ según las direcciones X', Y', Z' , respectivamente. Denotamos mediante $x', y', z', \alpha, \beta, \gamma$ las coordenadas en el SLOC. Este método se aplica sólo a rotaciones infinitesimales. Los diferenciales $d\alpha, d\beta, d\gamma$ no son diferenciales exactos, por lo tanto las coordenadas α, β, γ

* Los subíndices α, β y γ se refieren a las componentes del tensor en las direcciones de los ejes del cuerpo. Sin embargo, en el caso de los tensores asociados a las propiedades hidrodinámicas rotacionales o de acoplamiento preferimos emplear estos subíndices, en lugar de los subíndices x', y', z' utilizados para los otros tensores. La razón de esta elección resultará clara a partir de la sección 3.3.2, donde definiremos el sistema de coordenadas locales.

deben entenderse como puramente simbólicas. Para estudiar rotaciones finitas es necesario emplear un sistema de coordenadas curvilíneo, en nuestro caso el SL. Los cambios diferenciales en la posición y orientación del macroión en el SL y el SLOC vienen dados por

$$d\Omega = \begin{bmatrix} dx \\ dy \\ dz \\ d\phi \\ d\theta \\ d\psi \end{bmatrix} \quad (3.12)$$

$$d\Sigma = \begin{bmatrix} dx' \\ dy' \\ dz' \\ d\alpha \\ d\beta \\ d\gamma \end{bmatrix} \quad (3.13)$$

La relación entre las variaciones en ambos sistemas de coordenadas es

$$d\Omega = [U]^{-1} d\Sigma \quad (3.14)$$

donde

$$[U]^{-1} = \begin{bmatrix} [R]^{-1} & [0] \\ [0] & [B]^{-1} \end{bmatrix} \quad (3.15)$$

Aquí $[R]^{-1}$ es la matriz de rotación de Euler del sistema de ejes del cuerpo al sistema de ejes del laboratorio (Ec.(2.6)) y $[B]^{-1}$ es la matriz de transformación del vector velocidad angular entre ambos sistemas de coordenadas dada por²⁸

$$[B]^{-1} = \begin{bmatrix} \csc \theta \operatorname{sen} \psi & \cos \psi \csc \theta & 0 \\ \cos \psi & -\operatorname{sen} \psi & 0 \\ -\cot \theta \operatorname{sen} \psi & -\cos \psi \cot \theta & 1 \end{bmatrix} \quad (3.16)$$

Para finalizar este ítem referido a los sistemas de coordenadas realizaremos algunas consideraciones, que serán de utilidad más adelante, respecto de la métrica en dichos sistemas. En general, la distancia o elemento de arco entre dos puntos de coordenadas q_i y $q_i + dq_i$ viene dada por $ds^2 = \sum g_{ij} dq_i dq_j$, donde las g_{ij} son funciones de las coordenadas q_i, q_j que determinan los elementos del tensor métrico del espacio. El cuadrado del elemento de arco en el SLOC es $ds^2 = dx'^2 + dy'^2 + dz'^2 + d\alpha^2 + d\beta^2 + d\gamma^2$. El tensor métrico $[G]$ en dicho sistema tiene elementos $g_{ij} = \delta_{ij}$, con $i, j = x', y', z', \alpha, \beta, \gamma$, donde δ_{ij} es la delta de Krönecker. El tensor métrico en el SL se puede obtener mediante transformación tensorial del tensor métrico en el SLOC. Para ello se debe tener en cuenta que el tensor métrico es un

tensor covariante de segundo orden cuya ley de transformación tensorial viene dada en forma matricial por⁵

$$[\bar{G}] = [U]^t [G] [U] \quad (3.17)$$

De esta manera resulta

$$[\bar{G}] = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & \cos\theta \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \cos\theta & 1 \end{bmatrix} \quad (3.18)$$

3.4 Ecuación de Langevin

Consideremos una solución diluida de fragmentos de ADN descritos mediante el modelo MTA presentado en la sección 3.3. Además, consideremos que sobre la solución actúa un campo eléctrico \mathbf{E} estático y homogéneo, dirigido según el Z del SL. A continuación estableceremos las ecuaciones de Langevin para los movimientos de traslación y rotación de las moléculas. Estas ecuaciones permitirán el cálculo de los momentos de deriva y difusión, los que serán necesarios al momento de plantear la ecuación de Fokker-Planck.

Por simplicidad, las ecuaciones de movimiento se plantean y resuelven en el SLOC. En tal sistema de coordenadas las ecuaciones de movimiento de Langevin vienen dadas por

$$m \frac{d\mathbf{v}}{dt} = -m \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{v} + \mathbf{F}^e - [K] \mathbf{v} - [C^O]^t \boldsymbol{\omega} + \mathbf{F}(t) \quad (3.19)$$

$$[I^O] \frac{d\boldsymbol{\omega}}{dt} = -\boldsymbol{\omega} \times [I^O] \boldsymbol{\omega} + \mathbf{T}^e - [C^O] \mathbf{v} - [\Theta^O] \boldsymbol{\omega} + \mathbf{T}(t) \quad (3.20)$$

La fuerza $\mathbf{F}^e = q\mathbf{E}$ y el torque $\mathbf{T}^e = ([\alpha^E] \mathbf{E}) \times \mathbf{E}$ son debidos a la interacción entre el MTA y el campo eléctrico aplicado. Los términos proporcionales a \mathbf{v} y $\boldsymbol{\omega}$ son las fuerzas y los torques de fricción hidrodinámicos, tal como están dados por la Ecs.(3.4) y (3.5). $\mathbf{F}(t)$ y $\mathbf{T}(t)$ son una fuerza y un torque aleatorios, cuyos promedios temporales son nulos, generados en las múltiples colisiones aleatorias con las moléculas del medio. Los términos $-m \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{v}$ y $-\boldsymbol{\omega} \times [I^O] \boldsymbol{\omega}$ son de carácter inercial y se incluyen debido a que los vectores se expresan en términos de sus representaciones según las direcciones instantáneas X' , Y' , Z' ²⁹. Sin embargo, de aquí en adelante despreciaremos tales términos porque los supondremos

pequeños respecto de los términos viscosos. Esta aproximación es consistente con la suposición de número de Reynolds bajo²⁶.

Desarrollando por componentes las Ecs.(3.19) (3.20) en el SLOC resultan las siguientes ecuaciones

$$\begin{aligned}
m\ddot{x}' &= F_{x'}^e - k_{x'x'}\dot{x}' + F_{x'}(t) \\
m\ddot{y}' &= F_{y'}^e - k_{y'y'}\dot{y}' - c_{\gamma y'}\dot{\gamma} + F_{y'}(t) \\
m\ddot{z}' &= F_{z'}^e - k_{z'z'}\dot{z}' - c_{\beta z'}\dot{\beta} + F_{z'}(t) \\
I_{x'x'}\ddot{\alpha} &= T_{x'}^e - \theta_{\alpha\alpha}\dot{\alpha} + T_{x'}(t) \\
I_{y'y'}\ddot{\beta} &= T_{y'}^e - \theta_{\beta\beta}\dot{\beta} - c_{\beta z'}\dot{z}' + T_{y'}(t) \\
I_{z'z'}\ddot{\gamma} &= T_{z'}^e - \theta_{\gamma\gamma}\dot{\gamma} - c_{\gamma y'}\dot{y}' + T_{z'}(t)
\end{aligned} \tag{3.21}$$

Considerando el estado cuasi-estacionario, es decir cuando las aceleraciones se anulan, y realizando el promedio estadístico en el ensamble, el conjunto de Ecs.(3.21) puede ser resuelto para las velocidades medias $\langle \dot{x}', \dot{y}', \dot{z}', \dot{\alpha}, \dot{\beta}, \dot{\gamma} \rangle$. Expresando el resultado en términos de los elementos del gran tensor de difusión resulta

$$\begin{bmatrix} \langle \dot{x}' \rangle \\ \langle \dot{y}' \rangle \\ \langle \dot{z}' \rangle \\ \langle \dot{\alpha} \rangle \\ \langle \dot{\beta} \rangle \\ \langle \dot{\gamma} \rangle \end{bmatrix} = \frac{1}{k_B T} \begin{bmatrix} D_{x'x'} F_{x'}^e \\ D_{y'y'} F_{y'}^e + D_{\gamma y'} T_{z'}^e \\ D_{z'z'} F_{z'}^e + D_{\beta z'} T_{y'}^e \\ D_{\alpha\alpha} T_{x'}^e \\ D_{\beta\beta} T_{y'}^e + D_{\beta z'} F_{z'}^e \\ D_{\gamma\gamma} T_{z'}^e + D_{\gamma y'} F_{y'}^e \end{bmatrix} \tag{3.22}$$

3.5 Ecuación de Fokker-Planck

Nos interesa aquí determinar la función de distribución en el espacio de configuraciones $f(\mathbf{\Omega}, t)$ cuando se aplica un campo eléctrico estático y homogéneo en la dirección del eje Z del SL. La función $f(\mathbf{\Omega}, t)$ representa la densidad de probabilidad de encontrar una molécula con coordenadas entre $\mathbf{\Omega}$ y $\mathbf{\Omega} + d\mathbf{\Omega}$ al tiempo t en el SL. Para calcular tal función de distribución debemos resolver la ecuación de Fokker-Planck del sistema, a menudo denominada también ecuación de Smoluchowski. Empezamos expresando la ecuación de Fokker-Planck en el SLOC de la siguiente manera

$$\frac{\partial f(\boldsymbol{\Sigma}, t)}{\partial t} = -\bar{\nabla}_{\boldsymbol{\Sigma}} \cdot \mathbf{J}(\boldsymbol{\Sigma}, t) \quad (3.23)$$

donde $\boldsymbol{\Sigma} = \langle x', y', z', \alpha, \beta, \gamma \rangle$, $\bar{\nabla}_{\boldsymbol{\Sigma}} = \langle \partial/\partial x', \partial/\partial y', \partial/\partial z', \partial/\partial \alpha, \partial/\partial \beta, \partial/\partial \gamma \rangle$ y $\mathbf{J}(\boldsymbol{\Sigma}, t)$ es el vector flujo o corriente de probabilidad dado por

$$\mathbf{J}(\boldsymbol{\Sigma}, t) = \mathbf{M}_1 f(\boldsymbol{\Sigma}, t) - \frac{1}{2} \bar{\nabla} ([M_2] f(\boldsymbol{\Sigma}, t)) \quad (3.24)$$

El primer término de $\mathbf{J}(\boldsymbol{\Sigma}, t)$ representa el flujo convectivo ocasionado por los agentes externos presentes, en nuestro caso el campo eléctrico aplicado. El segundo término representa el flujo difusivo asociado con los gradientes de concentración. El vector \mathbf{M}_1 se denomina momento de deriva y es igual a la velocidad media de las moléculas, por lo que viene determinado a través de la Ec.(3.22). $[M_2]$ es el momento de difusión cuyos elementos se definen de la siguiente manera

$$[M_2]_{ij} = \frac{\langle \Delta i(\tau) \Delta j(\tau) \rangle}{\tau} \quad (3.25)$$

donde $\Delta i(\tau)$ y $\Delta j(\tau)$, con $i, j = x', y', z', \alpha, \beta, \gamma$, son los desplazamientos según las direcciones i y j respectivamente, durante un intervalo de tiempo τ que es macroscópicamente infinitesimal y microscópicamente grande, es decir mucho mayor que la escala de tiempo de las fluctuaciones Brownianas. En principio, para determinar $[M_2]$ deberíamos integrar el conjunto de ecuaciones dadas por la Ec.(3.21) a fin de obtener los desplazamientos cuadráticos medios. No obstante, aquí adoptaremos una manera más simple que consiste en aplicar la relación $[M_2] = 2[D]$, cuya validez en el caso de partículas rígidas de forma arbitraria ha sido demostrada por Brenner⁵. De esta manera se obtiene

$$[M_2] = 2 \begin{bmatrix} D_{x'x'} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & D_{y'y'} & 0 & 0 & 0 & D_{\gamma y'} \\ 0 & 0 & D_{z'z'} & 0 & D_{\beta z'} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & D_{\alpha\alpha} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & D_{\beta z'} & 0 & D_{\beta\beta} & 0 \\ 0 & D_{\gamma y'} & 0 & 0 & 0 & D_{\gamma\gamma} \end{bmatrix} \quad (3.26)$$

Notemos que en nuestro caso $[M_2]$ no depende de las coordenadas. Por lo tanto, reemplazando la Ec.(3.24) en la Ec.(3.23) resulta

$$\frac{\partial f(\boldsymbol{\Sigma}, t)}{\partial t} = -\bar{\nabla}_{\boldsymbol{\Sigma}} \cdot \left(\mathbf{M}_1 f(\boldsymbol{\Sigma}, t) - \frac{1}{2} [M_2] \bar{\nabla} f(\boldsymbol{\Sigma}, t) \right) \quad (3.27)$$

Realizando la transformación correspondiente la última ecuación puede expresarse en el sistema de coordenadas del laboratorio de la siguiente manera

$$\frac{\partial f(\boldsymbol{\Omega}, t)}{\partial t} = -\frac{1}{\sqrt{g}} \bar{\nabla} \cdot \left(\sqrt{g} \bar{\mathbf{M}}_1 f(\boldsymbol{\Omega}, t) - \frac{1}{2} \sqrt{g} [\bar{M}_2] \bar{\nabla} f(\boldsymbol{\Omega}, t) \right) \quad (3.28)$$

donde $\boldsymbol{\Omega} = \langle x', y', z', \phi, \theta, \psi \rangle$, $\bar{\nabla} = \langle \partial/\partial x', \partial/\partial y', \partial/\partial z', \partial/\partial \phi, \partial/\partial \theta, \partial/\partial \psi \rangle$ y $\sqrt{g} = \text{sen } \theta$ es el determinante del tensor métrico que en las Ec.(3.23) y Ec.(3.27) fue omitido porque éste es igual a uno en el SLOC.

$\bar{\mathbf{M}}_1$ y $[\bar{M}_2]$ son los momentos de deriva y difusión respectivamente, en el SLAB. El primero de ellos está determinado mediante la transformación

$$\bar{\mathbf{M}}_1 = [U]^{-1} \mathbf{M}_1 \quad (3.29)$$

donde $[U]^{-1}$ esta dada por la Ec.(3.15).

Para obtener $[\bar{M}_2]$ debemos considerar que éste es un tensor contravariante de orden dos. Su correspondiente ley de transformación viene dada en forma matricial por⁵

$$[\bar{M}_2] = [U]^{-1} [M_2] ([U]^T)^{-1} \quad (3.30)$$

Empleando la Ec.(3.15) y la siguiente relación matricial

$$\begin{bmatrix} [a] & [b] \\ [c] & [d] \end{bmatrix}^T = \begin{bmatrix} [a]^T & [c]^T \\ [b]^T & [d]^T \end{bmatrix} \quad (3.31)$$

resulta

$$[\bar{M}_2] = 2 \begin{bmatrix} [R]^{-1} [D_r^O] [R] & [R]^{-1} [D_c^O]^T ([B]^{-1})^T \\ [B]^{-1} [D_c^O] [R] & [B]^{-1} [D_r] ([B]^{-1})^T \end{bmatrix} \quad (3.32)$$

A continuación realizaremos algunas consideraciones a efectos simplificar el número de variables en nuestro problema. En primer lugar restringiremos nuestro estudio al estado estacionario, por lo que omitiremos la dependencia de f con el tiempo. Además, supondremos que el movimiento electroforético no alcanza a modificar apreciablemente la concentración espacial de moléculas en el tiempo en que se alcanza el equilibrio orientacional. De esta manera la función f será independiente de las coordenadas x, y, z .

Finalmente, supondremos que f es independiente del ángulo ϕ dado que el campo eléctrico introduce una simetría cilíndrica en la solución alrededor del eje Z del laboratorio. Lo último, aunque no haya sido demostrado, no es una suposición propiamente dicha sino una condición que debe cumplirse para que la solución se comporte como un cristal uniaxial. Teniendo en cuenta las simplificaciones mencionadas la Ec.(3.28) resulta

$$\left(Q_{\theta\theta} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} + Q_{\psi\psi} \frac{\partial^2}{\partial \psi^2} + Q_{\psi\theta} \frac{\partial^2}{\partial \psi \partial \theta} + Q_{\theta} \frac{\partial}{\partial \theta} + Q_{\psi} \frac{\partial}{\partial \psi} + Q_{00} \right) f(\theta, \psi) = 0 \quad (3.33)$$

donde

$$Q_{\theta\theta} = (D_{\alpha\alpha} \cos^2 \psi + D_{\beta\beta} \sen^2 \psi)$$

$$Q_{\psi\psi} = (D_{\alpha\alpha} \sen^2 \psi \cot^2 \theta + D_{\beta\beta} \cos^2 \psi \cot^2 \theta + D_{\gamma\gamma})$$

$$Q_{\psi\theta} = 2(D_{\beta\beta} - D_{\alpha\alpha}) \sen \psi \cos \psi \cot \theta$$

$$Q_{\theta} = \cot \theta (D_{\alpha\alpha} \sen^2 \psi + D_{\beta\beta} \cos^2 \psi) - \frac{E^2}{k_B T} \cos \theta \sen \theta [(\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) D_{\alpha\alpha} \cos^2 \psi - (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) D_{\beta\beta} \sen^2 \psi] + \frac{qE}{k_B T} D_{\beta z'} \cos \theta \sen \psi$$

$$Q_{\psi} = \frac{\cos \psi}{\sen^2 \theta} \left\{ \frac{E^2}{k_B T} \sen^2 \theta \sen \psi [D_{\gamma\gamma} (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{x'x'}^E) \sen^2 \theta + D_{\beta\beta} (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) \cos^2 \theta + D_{\alpha\alpha} (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) \cos^2 \theta] + \frac{qE}{k_B T} \sen \theta (D_{\beta z'} \cos^2 \theta - D_{\gamma y'} \sen^2 \theta) + (D_{\alpha\alpha} - D_{\beta\beta}) \sen \psi (\cos^2 \theta + 1) \right\}$$

$$Q_{00} = -\frac{1}{\sen \theta} \left\{ \frac{qE}{k_B T} (D_{\beta z'} - D_{\gamma y'}) \sen \psi \sen^2 \theta + \frac{E^2}{k_B T} D_{\gamma\gamma} (\alpha_{x'x'}^E - \alpha_{y'y'}^E) \sen^3 \theta (2 \cos^2 \psi - 1) + \frac{E^2}{k_B T} D_{\alpha\alpha} (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) \sen \theta (\cos^2 \theta - \sen^2 \theta \cos^2 \psi) + \frac{E^2}{k_B T} D_{\beta\beta} (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) \sen \theta (\sen^2 \theta \sen^2 \psi - \cos^2 \theta) \right\}$$

Sea f^0 a la función de distribución orientacional en ausencia de campo eléctrico aplicado. Sabemos que f^0 es constante porque al no haber dirección preferencial en el espacio todas las orientaciones son igualmente probables. Al aplicar el campo eléctrico sobre la solución la función de distribución cambia respecto del valor f^0 . En este trabajo incluiremos dicho cambio adicionando a f^0 un término $f^E(\theta, \psi)$ que representa las modificaciones

ocasionadas por el campo eléctrico, es decir

$$f(\theta, \psi) = f^0 + f^E(\theta, \psi) \quad (3.34)$$

Reemplazando la Ec.(3.34) en la Ec.(3.33) se encuentra que $f^E(\theta, \psi)$ satisface la siguiente ecuación diferencial

$$\left(Q_{\theta\theta} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} + Q_{\psi\psi} \frac{\partial^2}{\partial \psi^2} + Q_{\psi\theta} \frac{\partial^2}{\partial \psi \partial \theta} + Q_{\theta} \frac{\partial}{\partial \theta} + Q_{\psi} \frac{\partial}{\partial \psi} + Q_{00} \right) f^E = -Q_{00} f^0 \quad (3.35)$$

De esta manera, el problema de calcular la función de distribución orientacional se traslada al cálculo del término $f^E(\theta, \psi)$ que resulta de las modificaciones inducidas por el campo eléctrico presente. Con dicho objetivo, en la siguiente sección se procede a la resolución de la Ec.(3.35).

3.6 Resolución numérica de la ecuación de Fokker-Planck

La resolución numérica de la Ec.(3.35) se realiza mediante el método de diferencias finitas³⁰ (MDF). De acuerdo con este método empezamos construyendo una grilla de puntos discretos θ_l, ψ_m sobre el dominio de la función f^E determinado por los intervalos $0 \leq \theta \leq \pi$ y $0 \leq \psi \leq 2\pi$. Si denominamos n_θ y n_ψ al número de puntos discretos de la grilla según las direcciones θ y ψ respectivamente, cada punto interior de la grilla es generado por las relaciones

$$\begin{aligned} \theta_l &= \theta_{l-1} + \Delta\theta & l &= 1, 2, \dots, n_\theta - 2 \\ \psi_m &= \psi_{m-1} + \Delta\psi & m &= 1, 2, \dots, n_\psi - 2 \end{aligned} \quad (3.36)$$

con $\theta_0 = 0$, $\psi_0 = 0$, $\theta_{n_\theta-1} = \pi$ y $\psi_{n_\psi-1} = 2\pi$. Los espaciamientos entre puntos adyacentes de la grilla son $\Delta\theta = \pi / (n_\theta - 1)$ y $\Delta\psi = 2\pi / (n_\psi - 1)$

Las derivadas de la función f^E presentes en la Ec.(3.35) se reemplazan por expresiones aproximadas que se obtienen desarrollando la función en series de Taylor. Utilizando la aproximación de diferencia central se obtienen las siguientes aproximaciones para las derivadas de f^E evaluadas en los puntos de la grilla

$$\left. \frac{\partial f^E}{\partial \theta} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l+1,m}^E - f_{l-1,m}^E}{2\Delta\theta} \quad (3.37)$$

$$\left. \frac{\partial f^E}{\partial \psi} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l,m+1}^E - f_{l,m-1}^E}{2 \Delta \psi} \quad (3.38)$$

$$\left. \frac{\partial^2 f^E}{\partial \theta^2} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l+1,m}^E - 2f_{l,m}^E + f_{l-1,m}^E}{\Delta \theta^2} \quad (3.39)$$

$$\left. \frac{\partial^2 f^E}{\partial \psi^2} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l,m+1}^E - 2f_{l,m}^E + f_{l,m-1}^E}{\Delta \psi^2} \quad (3.40)$$

$$\left. \frac{\partial^2 f^E}{\partial \psi \partial \theta} \right|_{l,m} \approx \frac{1}{2 \Delta \theta \Delta \psi} (f_{l+1,m+1}^E + f_{l-1,m-1}^E + 2f_{l,m}^E - f_{l+1,m}^E - f_{l-1,m}^E - f_{l,m+1}^E - f_{l,m-1}^E) \quad (3.41)$$

donde los subíndices i, j , con $i = l, l \pm 1$ y $j = m, m \pm 1$, que acompañan a f^E significan que la función debe evaluarse en el punto θ_i, ψ_j . Emplearemos esta nomenclatura en el resto del capítulo.

Utilizando estas aproximaciones para las derivadas, a partir de la Ec.(3.35) resulta

$$H_1 f_{l+1,m}^E + H_2 f_{l,m}^E + H_3 f_{l-1,m}^E + H_4 f_{l,m+1}^E + H_5 f_{l,m-1}^E + H_6 f_{l+1,m+1}^E + H_7 f_{l-1,m-1}^E = H_8 f^0 \quad (3.42)$$

donde

$$H_1 = \frac{Q_{\theta\theta}}{\Delta \theta^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2 \Delta \theta \Delta \psi} + \frac{Q_\theta}{2 \Delta \theta} \Big|_{l,m} \quad (3.43)$$

$$H_2 = -\frac{2Q_{\theta\theta}}{\Delta \theta^2} - \frac{2Q_{\psi\psi}}{\Delta \psi^2} + \frac{Q_{\psi\theta}}{\Delta \theta \Delta \psi} + Q_{\theta\theta} \Big|_{l,m} \quad (3.44)$$

$$H_3 = \frac{Q_{\theta\theta}}{\Delta \theta^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2 \Delta \theta \Delta \psi} - \frac{Q_\theta}{2 \Delta \theta} \Big|_{l,m} \quad (3.45)$$

$$H_4 = \frac{Q_{\psi\psi}}{\Delta \psi^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2 \Delta \theta \Delta \psi} + \frac{Q_\psi}{2 \Delta \psi} \Big|_{l,m} \quad (3.46)$$

$$H_5 = \frac{Q_{\psi\psi}}{\Delta \psi^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2 \Delta \theta \Delta \psi} - \frac{Q_\psi}{2 \Delta \psi} \Big|_{l,m} \quad (3.47)$$

$$H_6 = \frac{Q_{\psi\theta}}{2 \Delta \theta \Delta \psi} \Big|_{l,m} \quad (3.48)$$

$$H_7 = H_6 \quad (3.49)$$

$$H_8 = -Q_{00}|_{l,m} \quad (3.50)$$

Al variar l desde uno hasta $n_\theta - 2$ y m desde uno hasta $n_\psi - 2$, la Ec.(3.42) genera un conjunto de $(n_\theta - 2) \times (n_\psi - 2)$ ecuaciones lineales cuyas incógnitas son los $n_\theta \times n_\psi$ valores que adopta la función f^E en los puntos de la grilla. Por otro lado, las condiciones de contorno generan también una serie de ecuaciones que junto a las antes mencionadas constituyen un sistema con igual número de ecuaciones que de incógnitas.

A fin de establecer las condiciones de contorno debemos determinar las componentes del flujo de probabilidad \mathbf{J} según las direcciones θ y ψ . Realizando el cálculo correspondiente se puede demostrar que las mismas vienen dadas por

$$J_\theta(\theta, \psi) = \frac{E}{k_B T} \text{sen} \theta \cos \theta f \left\{ (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) E D_{\alpha\alpha} \cos^2 \psi \text{sen} \theta + \text{sen} \psi \left[-D_{\beta z'} q + (\alpha_{x'x'}^E - \alpha_{z'z'}^E) E D_{\beta\beta} \text{sen} \theta \text{sen} \psi \right] + \text{sen} \theta \left[(D_{\alpha\alpha} - D_{\beta\beta}) \cos \psi \cot \theta \text{sen} \psi \frac{\partial f}{\partial \psi} - (D_{\alpha\alpha} \cos^2 \psi + D_{\beta\beta} \text{sen}^2 \psi) \frac{\partial f}{\partial \theta} \right] \right\} \quad (3.51)$$

$$J_\psi(\theta, \psi) = \frac{E}{k_B T} \text{sen} \theta \cos \psi f \left\{ -D_{\beta z'} q \cos \theta \cot \theta - E \left[(\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) D_{\alpha\alpha} + (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) D_{\beta\beta} \right] \cos^2 \theta \text{sen} \psi + \text{sen} \theta \left[D_{\gamma y'} q + (\alpha_{x'x'}^E - \alpha_{y'y'}^E) E D_{\gamma\gamma} \text{sen} \theta \text{sen} \psi \right] - \text{sen} \theta \left(D_{\gamma\gamma} + D_{\beta\beta} \cos^2 \psi \cot^2 \theta + D_{\alpha\alpha} \cot^2 \theta \text{sen}^2 \psi \right) \frac{\partial f}{\partial \psi} + (D_{\alpha\alpha} - D_{\beta\beta}) \cos \theta \cos \psi \text{sen} \psi \frac{\partial f}{\partial \theta} \right\} \quad (3.52)$$

Las condiciones de contorno en θ son de tipo reflexivas, es decir $J_\theta(\theta = 0, \psi) = 0$ y $J_\theta(\theta = \pi, \psi) = 0$. Expresando f según la Ec.(3.34) y empleando la aproximación de diferencia central estas condiciones de contorno en θ implican que

$$f_{0,m+1}^E - f_{0,m-1}^E = 0 \quad m = 0, 1, 2, \dots, n_\psi - 1 \quad (3.53)$$

$$f_{n_\theta-1,m+1}^E - f_{n_\theta-1,m-1}^E = 0 \quad m = 0, 1, 2, \dots, n_\psi - 1 \quad (3.54)$$

Es conveniente resaltar que en las dos últimas ecuaciones m varia desde cero hasta $n_\psi - 1$. Al hacerlo se introducen puntos en la grilla que se pueden calificar como ficticios (Fig. 6.1), en el sentido que no pertenecen al dominio del problema. Los puntos ficticios corresponden a

ensanchamientos de la grilla hacia puntos con coordenadas $\psi = \psi_0 - \Delta\psi$ y $\psi = \psi_{n_\psi-1} + \Delta\psi$, donde la función adopta valores $f_{l,-1}^E$ y f_{l,n_ψ}^E . Estos valores ficticios de f^E introducen $2n_\psi$ incógnitas adicionales a nuestro problema que serán descartadas luego de resolver el sistema de ecuaciones porque no tienen significado físico alguno.

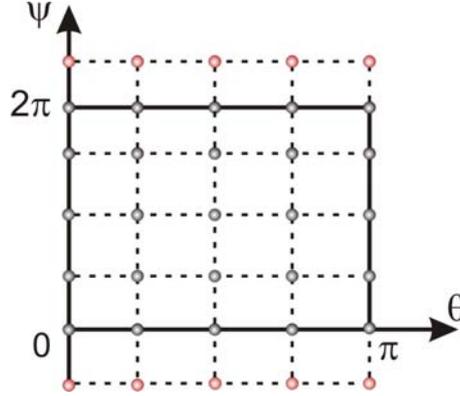


Fig. 3.1. Grilla expandida para el MDF

Las condiciones de contorno en ψ son periódicas debido a que los momentos $\overline{\mathbf{M}}_1$ y $[\overline{\mathbf{M}}_2]$ son funciones periódicas con respecto a esta variable con período 2π ³¹. Expresamos estas condiciones mediante las relaciones $f(\theta, \psi = 0) = f(\theta, \psi = 2\pi)$ y $J_\psi(\theta, \psi = 0) = J_\psi(\theta, \psi = 2\pi)$. Estas condiciones también pueden entenderse considerando que los ángulos $\psi = 0$ y $\psi = 2\pi$ corresponden a la misma orientación en el espacio. Expresando f según la Ec.(3.34) y aplicando la aproximación de diferencia central la periodicidad de f implica que

$$f_{l,0}^E - f_{l,n_\psi-1}^E = 0 \quad l = 0, 1, 2, \dots, n_\theta - 1 \quad (3.55)$$

Mientras que la periodicidad de J_ψ conduce a

$$\begin{aligned} & \frac{1}{4\Delta\psi} [D_{\beta\beta} + D_{\gamma\gamma} + (D_{\beta\beta} - D_{\gamma\gamma}) \cos(2\theta)] (f_{l,-1}^E - f_{l,1}^E - f_{l,n_\psi-2}^E + f_{l,n_\psi}^E) \\ & + \frac{qE}{k_B T} [D_{\gamma y} \sin^2 \theta - D_{\beta z} \cos^2 \theta +] \sin \theta (f_{l,0}^E - f_{l,n_\psi-1}^E) = 0 \end{aligned} \quad l = 0, 1, \dots, n_\theta - 1 \quad (3.56)$$

Notemos que al expandir la grilla e incorporar los puntos ficticios, la Ec.(3.42) aporta ahora $(n_\theta - 2) \times n_\psi$ ecuaciones que se generan haciendo $l = 1, 2, \dots, n_\theta - 2$ y $m = 0, 1, 2, \dots, n_\psi - 1$. Nuestro problema se reduce entonces a resolver el conjunto de

$n_\theta \times (n_\psi + 2)$ ecuaciones generadas por la Ec.(3.42) y las Ecs.(3.53) hasta (3.56) con $n_\theta \times (n_\psi + 2)$ incógnitas constituidas por los valores $f_{l,m}^E$ que adopta la función en los puntos de la grilla, incluidos los puntos ficticios.

Una vez calculada f^E se debe adicionarle el término constante f^0 para determinar la función de distribución orientacional f . Sin embargo, la aplicabilidad de f al cálculo de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos a través de las expresiones deducidas en el capítulo 2 (Ecs.(2.7) y (2.14)) requiere que la misma este normalizada. A tal fin, redefinimos la función de distribución de la siguiente manera

$$f(\theta, \psi) = \frac{f^0 + f^E(\theta, \psi)}{2\pi \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (f^0 + f^E) \sin\theta d\theta d\psi} \quad (3.57)$$

La integral presente en la Ec.(3.57) se resuelve numéricamente utilizando la regla del trapecio.

Como el valor de f^0 está definido a excepción de una constante de normalización, al momento de realizar los cálculos numéricos elegimos arbitrariamente $f^0 = 1$.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS TEÓRICO DE LAS DIFERENTES CONTRIBUCIONES A LA BIRREFRINGENCIA Y AL DICROÍSMO ELÉCTRICOS DE SOLUCIONES DE FRAGMENTOS DE ADN

4.1 Introducción

En este capítulo presentamos un análisis teórico de las diferentes contribuciones a la birrefringencia y al dicroísmo eléctricos estacionarios de fragmentos de ADN tipo arco. Por diferentes contribuciones queremos significar aquellas originadas en los distintos mecanismos de orientación de las moléculas, es decir a la interacción momento dipolar eléctrico inducido-campo eléctrico y al acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación, aunque haremos especial énfasis en la contribución última.

Los resultados del presente capítulo corresponden a fragmentos de ADN de 179 pb descritos mediante el modelo MTA. La longitud de arco y el diámetro se fijaron en 608,6 Å y 24 Å respectivamente, mientras que se asignaron diferentes valores para el ángulo de *bending*. Los parámetros hidrodinámicos utilizados para caracterizar a los fragmentos se obtuvieron utilizando el software hydro++³².

La constante de polarizabilidad eléctrica empleada es $K = 1,112 \times 10^{-17} F$ y la carga eléctrica $q = 0,16Q$, donde Q es la carga eléctrica de un fragmento de ADN cuando todos sus grupos fosfatos están ionizados. Los valores de polarizabilidad eléctrica correspondientes al valor asignado a K se muestran en la Tabla 4.1 para los diferentes ángulos de *bending* empleados en este capítulo.

Para calcular la función de distribución orientacional se resolvió la ecuación de Fokker-Planck del sistema aplicando el método de diferencias finitas, tal como se describió en el capítulo 3, utilizando una grilla con $n_\theta = n_\psi = 75$ puntos en cada dirección. Una vez conocida

la función de distribución se utilizaron las Ecs.(2.7) y (2.14) para calcular la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos respectivamente, en ambos casos para diferentes intensidades del campo eléctrico aplicado. Las integrales presentes en las Ecs.(2.7) y (2.14) se resolvieron numéricamente empelando la regla del trapecio.

Tabla. 4.1. Elementos principales del tensor $[\alpha^E]$

$2\gamma_0$ (°)	$\alpha_{x'x'}^E \times 10^{33}$ (Fm^2)	$\alpha_{y'y'}^E \times 10^{33}$ (Fm^2)	$\alpha_{z'z'}^E \times 10^{32}$ (Fm^2)
120	9,478	6,768	3,016
116	9,327	6,768	3,079
100	8,745	6,768	3,322
80	8,084	6,768	3,591
60	7,531	6,768	3,814

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Dicroísmo eléctrico

Diferentes contribuciones al dicroísmo eléctrico reducido (DER). Efecto anómalo

La Fig. 4.1 muestra los resultados teóricos del dicroísmo eléctrico reducido (DER) en función del campo eléctrico aplicado para el modelo MTA con los parámetros especificados en la sección anterior y un ángulo de *bending* igual a 116°. La Fig. 4.1 muestra también las contribuciones individuales al DER para orientaciones debidas solamente a la interacción momento dipolar eléctrico inducido-campo eléctrico y al acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación. En el primer caso, las moléculas tienden a orientarse en dirección paralela al campo eléctrico, motivo por el cual se genera una componente negativa en el dicroísmo eléctrico. Por el contrario, en el segundo caso, la componente del dicroísmo eléctrico es positiva porque las moléculas tienden a orientarse en dirección perpendicular al campo eléctrico.

El efecto conjunto de la polarizabilidad eléctrica y del acoplamiento hidrodinámico genera una señal de dicroísmo eléctrico positiva para intensidades de campo eléctrico bajo (Fig. 4.1). A medida que incrementa el campo eléctrico aplicado, el dicroísmo eléctrico disminuye y alcanza los valores negativos usuales asociados con una intensa componente debida a la polarizabilidad eléctrica. No obstante, se observa que la contribución del acoplamiento hidrodinámico, a pesar de perder notoriamente su predominio, permanece significativa aún para intensidades altas de campo eléctrico, tal como se muestra en la Fig. 4.1.

Como se mencionara en la introducción de esta tesis, el cambio de signo del dicroísmo

eléctrico (y también de la birrefringencia eléctrica) para campos eléctricos débiles es frecuentemente denominado efecto anómalo. Experimentalmente, el efecto anómalo se observa dependiendo de la longitud de los fragmentos de ADN y de la concentración salina⁴. Es posible explicar, al menos cualitativamente, tales observaciones empíricas mediante un argumento basado esencialmente en las propiedades de simetría de las moléculas. Como se mencionara en la introducción del capítulo 2, si los fragmentos de ADN son suficientemente cortos se puede considerar, en buena aproximación, que poseen simetría cilíndrica. En este caso la orientación tiene lugar solamente debido a la polarizabilidad eléctrica y, como muestran los resultados de este capítulo, el dichroísmo eléctrico es siempre negativo. Si, por el contrario, los fragmentos no son suficientemente cortos es necesario implementar modelos asimétricos, como por ejemplo el modelo MTA aquí utilizado. Para estos modelos, las propiedades hidrodinámicas son tales que la difusión traslacional está acoplada con la rotacional, generándose una componente de dichroísmo eléctrico positiva que para campos eléctricos de baja intensidad predomina por sobre aquella generada por la polarizabilidad eléctrica. El límite por debajo del cual los fragmentos de ADN pueden considerarse cortos no está definido con precisión, pero reportes experimentales muestran que es dependiente de la concentración salina²³.

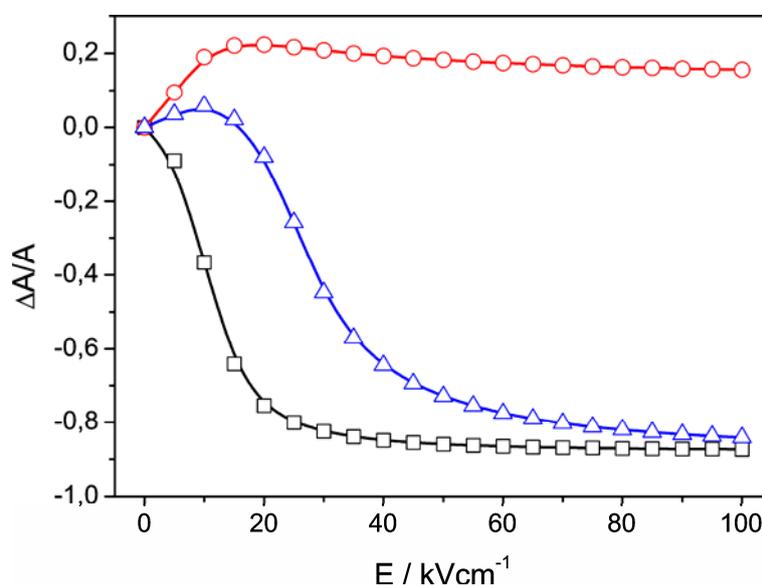


Fig. 4.1. DER de una solución de fragmentos de ADN descritos con el modelo MTA en función de la intensidad de campo eléctrico. (-□-) orientación debida a la polarizabilidad eléctrica, (-○-) orientación debida al acoplamiento hidrodinámico, (-△-) orientación debida a la polarizabilidad eléctrica y al acoplamiento hidrodinámico combinados.

Moléculas con diferentes ángulos de *bending*

La Fig. 4.2 muestra curvas teóricas de DER en función de la intensidad del campo eléctrico aplicado para el modelo MTA con diferentes ángulos de *bending*. Estas curvas muestran que la contribución positiva debido al acoplamiento hidrodinámico adquiere mayor importancia conforme incrementa el ángulo de *bending*. Para $2\gamma_0$ igual a 100° y 120° el dichroísmo eléctrico a campo eléctrico bajo es positivo, mientras para los ángulos de *bending* iguales a 60° y 80° el dichroísmo eléctrico es siempre negativo. Esto significa que para ángulos de *bending* pequeños la contribución del acoplamiento hidrodinámico no es suficientemente intensa como para producir la inversión de signo. Por lo tanto, el efecto anómalo, y la magnitud del mismo, están directamente relacionados con la asimetría del modelo, siendo este efecto más intenso cuanto mayor es la asimetría, es decir cuanto mayor es el ángulo de *bending*.

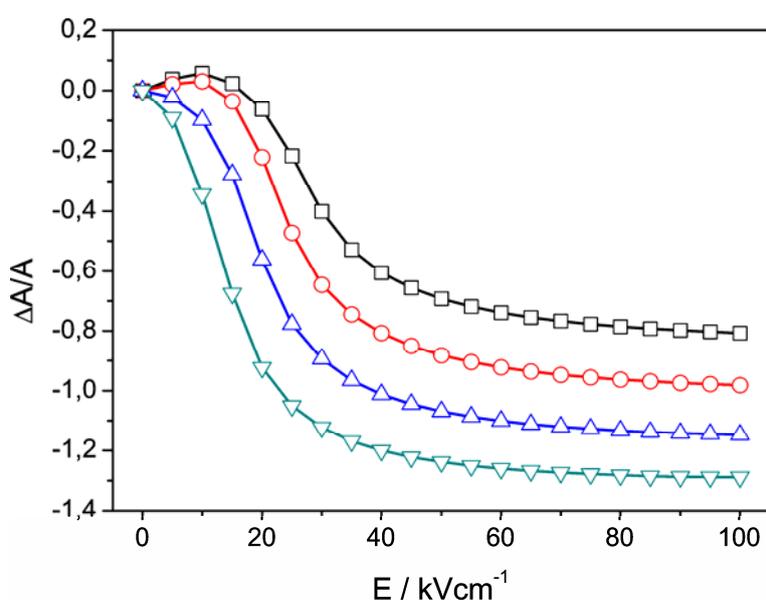


Fig. 4.2. DER en función de la intensidad de campo eléctrico de una solución de fragmentos de ADN descritos con el modelo MTA con diferentes ángulos de *bending*. (-□-) 120° , (-○-) 100° , (-△-) 80° , (-▽-) 60° .

Comparación con otros métodos

En este ítem contrastamos los resultados obtenidos en base a los desarrollos teóricos y los procedimientos numéricos aquí presentados, con aquellos resultados provenientes de la bibliografía actual.

Por un lado, se probó que los cálculos presentes concuerdan con aquellos que resultan de emplear expresiones analíticas aproximadas para la función de distribución orientacional de moléculas tipo arco rígido, cargados y polarizables, válidas para campos eléctricos de baja intensidad, reportadas por Bertolotto⁶. Dentro del límite donde la función de distribución orientacional reportada por estos autores es aplicable, que es aproximadamente de hasta 2 kV/cm , los resultados de ambos cálculos concuerdan cuantitativamente.

Por otro lado, se contrastaron los resultados teóricos que resultan de aplicar el presente estudio, con los resultados reportados por Antosiewicz y Porschke⁷, quienes estudian el problema mediante simulación dinámica Browniana. Con dicho fin se calculó el DER para diferentes intensidades de campo eléctrico empleando el modelo MTA con los mismos parámetros eléctricos, ópticos e hidrodinámicos utilizados por los autores recién mencionados. La Fig. 4.3 muestra que los resultados obtenidos con ambos métodos coinciden aceptablemente bien.

Además de diferir en el método de estudio, teoría y simulación computacional, los trabajos difieren en el sistema de referencia empleado para describir el problema físico. En el presente trabajo, el sistema del cuerpo se escoge con su origen en el centro de masa del MTA mientras que Antosiewicz y Porschke⁷ usan el origen en el centro de difusión. Es interesante realizar algunas consideraciones con respecto a la elección del origen del sistema de coordenadas del cuerpo. Para fragmentos de ADN es habitual considerar que los centros de carga positiva y negativa coinciden con el centro de masa. Esto significa que las moléculas carecen de momento dipolar eléctrico permanente, es decir que se consideran no polares. Sin embargo, como el sistema no es neutro, existe un momento eléctrico permanente, o cuasi-momento dipolar eléctrico permanente, no nulo si se calcula con respecto a un sistema con origen diferente al centro de carga³³. En este trabajo, el origen del sistema de coordenadas del cuerpo coincide con el centro de carga, razón por la cual ningún momento eléctrico permanente ha sido incluido. Por el contrario, Antosiewicz y Porschke⁷ utilizan el sistema de coordenadas del cuerpo con origen en el centro de difusión y, por lo tanto, incluyen el cuasi-momento dipolar eléctrico permanente. La equivalencia entre ambas descripciones ha sido demostrada anteriormente por Bertolotto⁶. Este autor encuentra que la contribución al DER debida al acoplamiento traslación-rotación de las moléculas cuando el origen del sistema del cuerpo coincide con el centro de carga resulta, si el origen coincide con el centro de difusión, en una contribución del momento eléctrico que es balanceada por el cambio del tensor de acoplamiento traslación-rotación debido a la traslación del origen. La concordancia entre los resultados mostrados en la Fig. 4.3 corrobora la equivalencia entre ambas elecciones para el

origen de coordenadas.

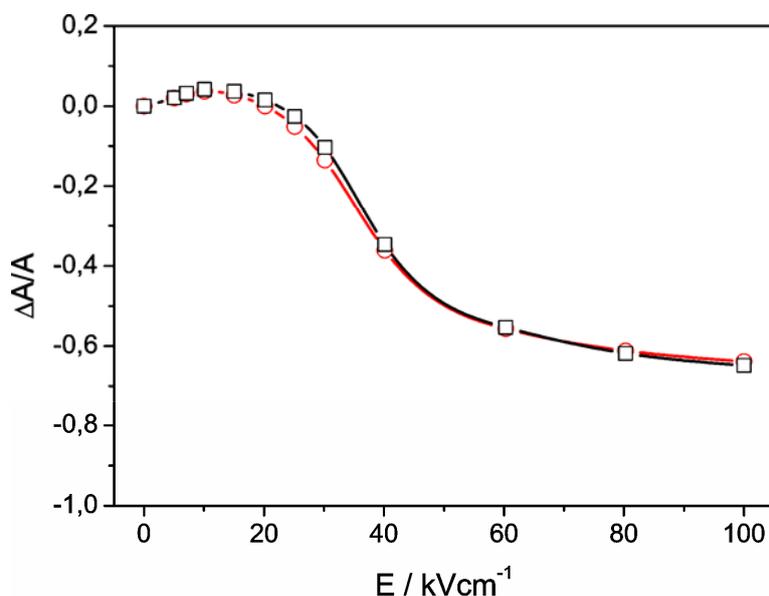


Fig. 4.3. DER en función de la intensidad de campo eléctrico de una solución de fragmentos de ADN descritos con el modelo MTA con los mismos parámetros utilizados por Porschke y Antosiewicz⁷. (-□-) valores obtenidos por Porschke y Antosiewicz⁷ con simulación dinámica Browniana, (-○-) valores teóricos obtenidos en el presente trabajo.

Estimación del error de cálculo numérico

Los resultados para el diroísmo eléctrico reducido presentados en este capítulo se obtuvieron en base a la función de distribución de orientaciones calculada mediante la resolución numérica de la ecuación de Fokker-Planck. En el capítulo 3 se describió el proceso de resolución de tal ecuación con el método de diferencias finitas. Para estimar el error cometido en el cálculo numérico de la función de distribución estudiaremos un caso particular, para el cual la solución analítica exacta de la ecuación de Fokker-Planck está perfectamente determinada. Con este propósito consideremos una molécula tipo MTA con $q = 0$. Al remover la carga eléctrica del macroión no hay migración electroforética. Por lo tanto, a fin de estudiar el proceso orientacional, anular la carga es equivalente a eliminar el acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación. En esta circunstancia el sistema es conservativo y la función de distribución en el estado estacionario es la función de distribución de Boltzmann (Ec. (3.1)). El error de cálculo numérico se estimó comparando los valores del diroísmo eléctrico reducido obtenidos mediante la función de distribución de Boltzmann y la solución numérica de la ecuación de Fokker-Planck para este caso particular.

La Fig. 4.4 muestra que los resultados de ambos cálculos concuerdan razonablemente bien en todo el rango de intensidades del campo eléctrico analizado. El error relativo porcentual se muestra en la Fig. 4.5. Este presenta un máximo para la intensidad de campo eléctrico más baja (1 kV/cm) y decrece rápidamente a medida que aumenta el campo eléctrico aplicado.

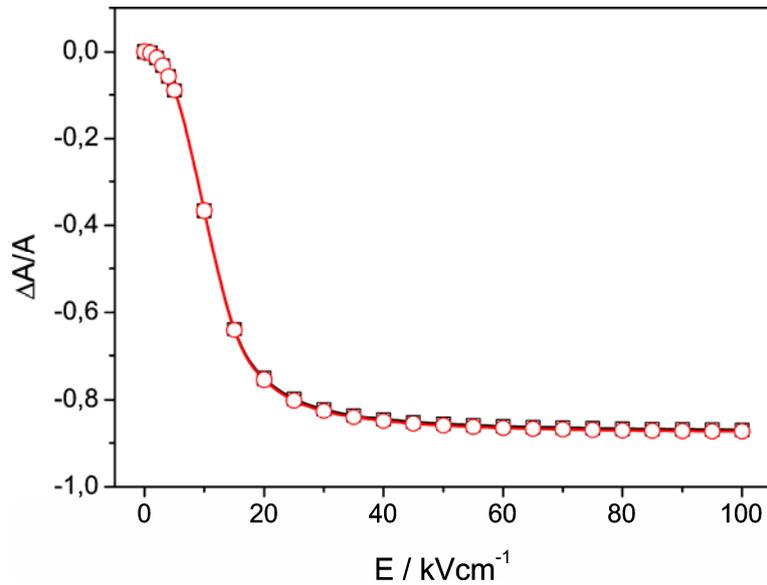


Fig. 4.4. DER en función de la intensidad de campo eléctrico de una solución de MTA con los siguientes parámetros: $q=0$ y $K=1,112 \times 10^{-17} F$. (-□-) valores obtenidos utilizando la función de distribución de Boltzmann, (-○-) valores obtenidos resolviendo la ecuación de Fokker-Planck para conocer la función de distribución.

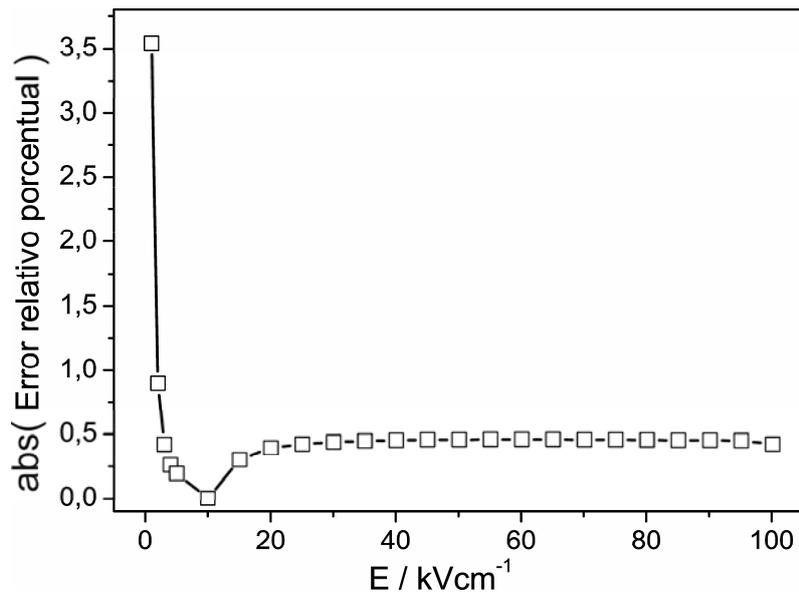


Fig. 4.5. Valor absoluto del error relativo porcentual correspondiente a los resultados mostrados en la Fig. 4.4.

4.2.2 Birrefringencia eléctrica

Diferentes contribuciones a la birrefringencia eléctrica. Efecto anómalo

Todos los resultados para la birrefringencia eléctrica presentados en este capítulo se obtuvieron utilizando el valor $\Delta = -3,177 \times 10^{-30} \text{ Fm}$ para la anisotropía de polarizabilidad óptica por unidad de longitud. Este valor se estimó como la razón entre la anisotropía de polarizabilidad óptica molecular y la longitud de cadena de moléculas de ADN, empleando para ello resultados experimentales reportados por Bertolotto et al.³⁴.

La Fig. 4.6 muestra las diferentes contribuciones a la birrefringencia eléctrica en función del campo eléctrico aplicado para el modelo MTA con un ángulo de *bending* de 116° . Al igual que en el caso del DER, se observa que el acoplamiento hidrodinámico y la polarizabilidad eléctrica generan componentes de diferente signo, siendo la contribución a la birrefringencia eléctrica positiva en el primer caso y negativa en el segundo. El efecto conjunto de ambas contribuciones ocasiona la inversión de signo en la birrefringencia eléctrica, la que cambia de positiva a negativa conforme incrementa la intensidad del campo eléctrico.

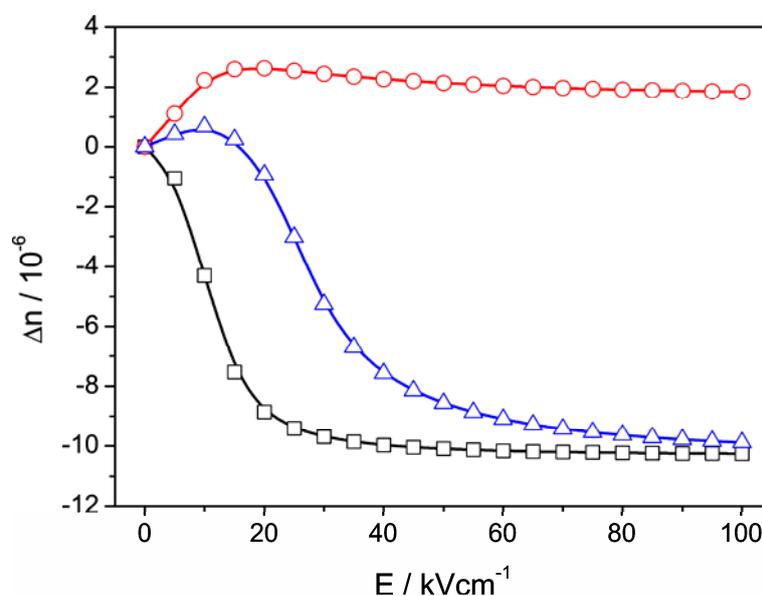


Fig. 4.6. Birrefringencia eléctrica de una solución de MTA en función de la intensidad de campo eléctrico. (-□-) orientación debida a la polarizabilidad eléctrica, (-○-) orientación debida al acoplamiento hidrodinámico, (-△-) orientación debida a la polarizabilidad eléctrica y al acoplamiento hidrodinámico combinados.

Moléculas con diferentes ángulos de *bending*

Los resultados muestran que al disminuir el ángulo de *bending* disminuye también la

componente positiva en la birrefringencia eléctrica (Fig. 4.7). Para ángulos de *bending* igual a iguales a 60° y 80° la magnitud de la componente debida al acoplamiento hidrodinámico es poco intensa. Para estos ángulos no se alcanza a registrar la inversión del signo para campos eléctrico de baja intensidad.

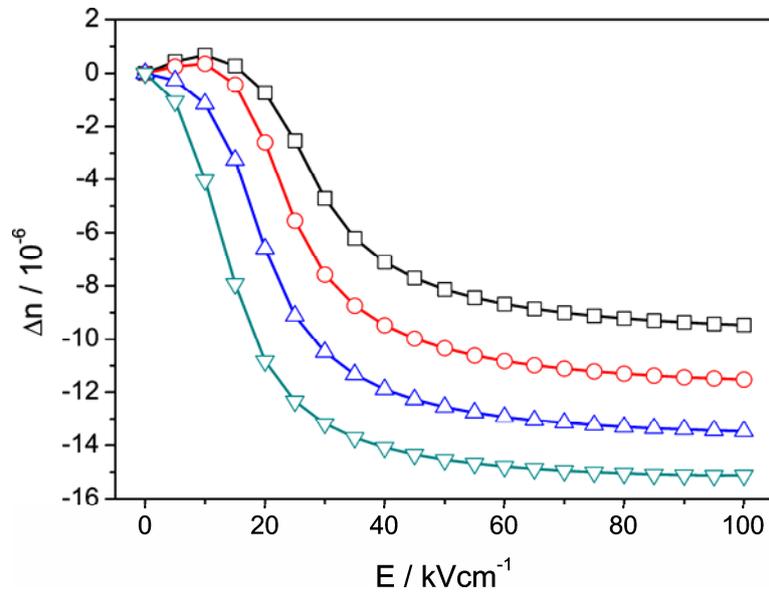


Fig. 4.7. Birrefringencia eléctrica en función de la intensidad de campo eléctrico de una solución de fragmentos de ADN descritos con el modelo MTA con diferentes ángulos de *bending*. (-□-) 120°, (-○-) 100°, (-△-) 80°, (-▽-) 60°.

Estimación del error de cálculo numérico

El error de cálculo numérico se estimó analizando la situación particular en que $q = 0$ y comparando los resultados para la birrefringencia eléctrica obtenidos mediante la función de distribución de Boltzmann y la solución numérica de la ecuación de Fokker-Planck. Los resultados de ambos cálculos se muestran en la Fig. 4.8. En todo el rango de intensidades de campo eléctrico analizado el error relativo porcentual (Fig. 4.9) resulta prácticamente igual a aquel estimado para el DER.

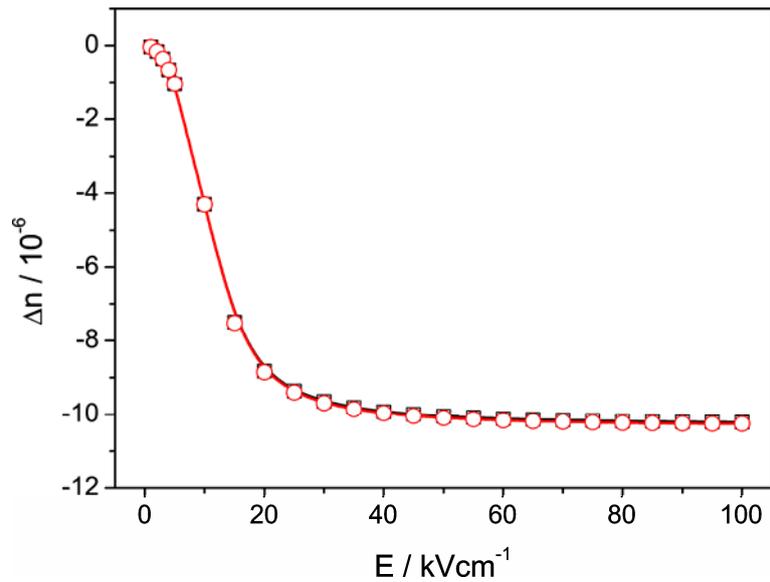


Fig. 4.8. Birrefringencia eléctrica en función de la intensidad de campo eléctrico de una solución de MTA con los siguientes parámetros: $q=0$ y $K=1,112 \times 10^{-17} F$. (-□-) valores obtenidos utilizando la función de distribución de Boltzmann, (-○-) valores obtenidos resolviendo la ecuación de Fokker-Planck para conocer la función de distribución.

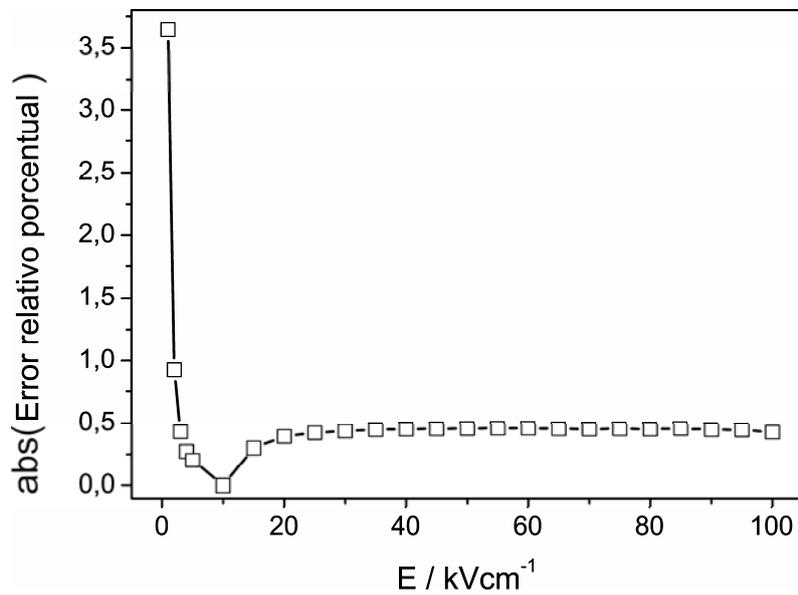


Fig. 4.9. Valor absoluto del error relativo porcentual correspondiente a los resultados mostrados en la Fig. 4.8.

4.2.3 Analogía entre los resultados obtenidos para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos

Es importante notar la semejanza que presentan las curvas de la birrefringencia y el

dicroísmo eléctricos en función del campo eléctrico aplicado. Ambas curvas exhiben el mismo comportamiento al incrementar la intensidad del campo eléctrico. Esta semejanza se observa, tanto para las contribuciones individuales de los diferentes mecanismos de orientación, como para orientaciones debidas conjuntamente a todos los procesos orientacionales (Figs. 4.1 y 4.6). Además, las curvas de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos muestran variaciones semejantes con el ángulo de *bending* (Figs. 4.2 y 4.7) y el mismo campo eléctrico de inversión.

La analogía entre los resultados encontrados para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos se explica porque el proceso orientacional es el mismo en ambos casos. Las expresiones dadas por las Ecs. (2.7) y (2.14) presentan la misma dependencia con las propiedades eléctricas e hidrodinámicas de las moléculas, las que determinan el grado orientacional de las mismas al aplicar el campo eléctrico.

4.3 Conclusiones del capítulo

Los resultados corroboran que el acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación genera una componente positiva relativamente intensa en la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN tipo arco. Aunque esta componente positiva es determinante para campos eléctricos de baja intensidad, en el sentido que explica el efecto anómalo, su contribución es significativa también para campos eléctricos de alta intensidad.

El efecto del acoplamiento hidrodinámico sobre la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos es mayor conforme disminuye la simetría de las moléculas.

Algunos de los resultados aquí obtenidos, y de las conclusiones que de éstos resultan, concuerdan con aquellos reportados en la bibliografía actual. Sin embargo, existe una importante diferencia entre el presente trabajo y los antes existentes. Los últimos pueden clasificarse en dos grupos que difieren en la técnica de estudio. Por un lado, aquellos que aplican simulación dinámica Browniana y, por el otro, los que aplican métodos teóricos cuyos resultados son aplicables en el límite de campos eléctricos de baja intensidad. Con respecto al primer grupo, la diferencia radica en el uso de técnicas de estudio completamente diferentes, teoría y simulación computacional, mientras que con respecto al segundo grupo se concuerda en el uso de métodos teóricos pero se extiende el rango de intensidades de campo eléctrico donde los resultados son aplicables.

El procedimiento para el cálculo numérico de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos aquí propuesto requiere poco tiempo de cálculo computacional, mucho menor que los costos requeridos por las técnicas de simulación computacional. Por lo tanto, este procedimiento

resulta una herramienta de gran interés para la determinación de parámetros moleculares mediante el ajuste de datos experimentales de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos en función del campo eléctrico aplicado.

CAPÍTULO 5

MEDICIONES DEL DICROÍSMO ELÉCTRICO DE SOLUCIONES DE ADN SONICADO. AJUSTES TEÓRICOS

5.1 Introducción

En este capítulo se describe el procedimiento experimental para medir el DER de soluciones, se presentan los resultados experimentales obtenidos para soluciones de ADN sonicado y se realiza el ajuste teórico de las curvas de DER en función de la intensidad del campo eléctrico obtenidas en las experiencias.

Como mencionamos en la introducción del capítulo 2 las soluciones de ADN sonicado son polidispersas. La distribución de tamaños se caracteriza empleando datos experimentales provenientes de experiencias de electroforesis en gel de soluciones de ADN sonicado.

El ajuste de las curvas experimentales de DER versus la intensidad del campo eléctrico se realiza en base a los desarrollos teóricos presentados en los capítulos 2 y 3 para el DER del MTA. Para incluir la polidispersión de la muestra en el análisis teórico describimos a la solución como una mezcla de arcos rígidos de diferentes longitudes, de acuerdo a la distribución de tamaños provenientes de las electroforesis en gel.

Producto del ajuste teórico de los resultados experimentales se determinan la constante de polarizabilidad eléctrica de las moléculas y el factor de carga efectiva.

5.2 Procedimiento experimental

5.2.1 Preparación de las muestras

Se utilizó ADN de timo de ternera altamente polimerizado marca SIGMA, tipo I, cat. D1501. Se sonicó una solución acuosa de 100 mg/dl de ADN en 1mM NaCl. El proceso de sonicado se realizó 30 veces durante 60 segundos cada vez, intercaladas con períodos de reposo de 30 segundos de duración, conservando la muestra a 5°C. Para medir el dicroísmo eléctrico, la solución sonicada se diluyó hasta alcanzar una concentración de ADN de 5 mg/dl.

5.2.2 Equipo experimental para medir el dicroísmo eléctrico reducido (DER)

Las mediciones de dicroísmo eléctrico se realizaron utilizando un equipo diseñado en nuestro laboratorio³⁵. El equipo dispone de una fuente de luz ultravioleta, un monocromador y un polarizador (P) de Glan-Taylor 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 100 ns y 10 ms, una celda de Kerr de 0.15 cm de distancia entre electrodos planos de platino y 1 cm de camino óptico, un fotomultiplicador 1P28 (FM) y un osciloscopio marca Tektronix TDS 1012 con dos canales, de 100MHz, conectado mediante una interfaz a una computadora. La Fig. 5.1 muestra el esquema general del sistema óptico del equipo de medición.

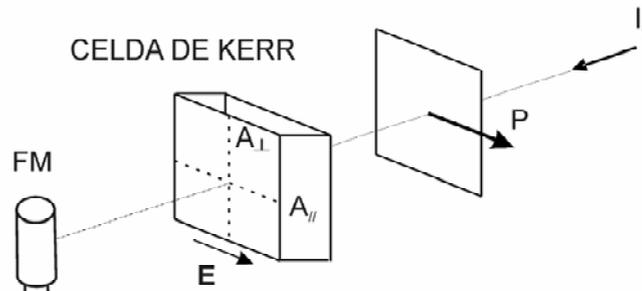


Fig. 5.1. Esquema general del sistema óptico para medir el dicroísmo eléctrico.

5.2.3 Determinación experimental del dicroísmo eléctrico reducido (DER) en función del campo eléctrico

Para realizar las mediciones se coloca la solución a estudiar en la celda de Kerr y se aplica un pulso rectangular de campo eléctrico sobre los electrodos de la celda. La luz proveniente de la fuente se hace pasar por el monocromador que permite fijar la longitud de onda deseada, en este caso 260 nm. A continuación el haz de luz pasa por el polarizador que se dispone con su eje de transmisión paralelo al campo eléctrico aplicado en la celda de Kerr. Finalmente el haz de luz emergente llega al fotomultiplicador.

Previo al fotomultiplicador se ubica un sector rotante que impide intermitentemente el paso del haz de luz. Con este sector rotante en movimiento, sin aplicar campo eléctrico sobre la solución, se registran dos líneas paralelas en la pantalla del osciloscopio. Estas dos líneas corresponden, una a la señal cuando la luz incide sobre el fotomultiplicador y la otra cuando la luz no incide. La distancia entre estas líneas es proporcional a la intensidad de luz I que

incide sobre el fotomultiplicador en ausencia de campo eléctrico. A continuación, con el sector rotante en reposo y sin obstruir el paso de luz se aplica un pulso de campo eléctrico sobre la solución y se registra en la pantalla del osciloscopio el cambio en la intensidad luminosa $\Delta I_{//}$ y el pulso eléctrico.

Finalmente, el DER se determina siguiendo un procedimiento descrito por Fredericq y Houssier¹⁹. Estos autores demuestran que el DER viene dado por la relación

$$\frac{\Delta A}{A} = -1,5 \log \left(1 + \frac{\Delta I_{//}}{I} \right) \quad (5.1)$$

donde I y A son la intensidad de luz transmitida y la absorbancia de la solución respectivamente, medidas 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 medidas en presencia de campo eléctrico aplicado y luz incidente con su plano de polarización según la dirección paralela a éste. Las cantidades $\Delta I_{//}$ e $I_{//}$ pueden registrarse en el osciloscopio ya que son proporcionales a las señales de potencial eléctrico en el oscilograma. La absorbancia A se mide con un espectrofotómetro convencional.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Caracterización de soluciones 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 utilizó un marcador de peso molecular *ladder* de 100 pb. La Fig. 5.2 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 5.1.

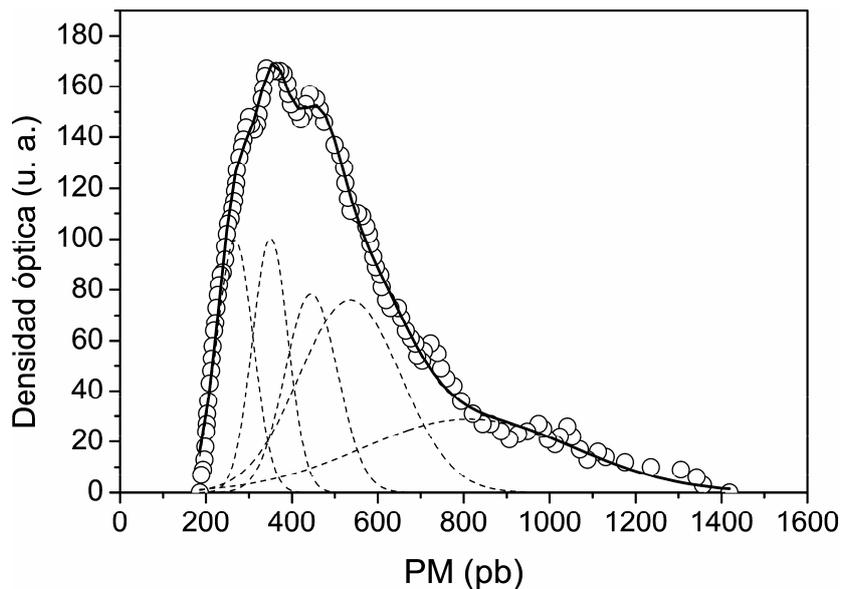


Fig. 5.2. Distribución de tamaños de los fragmentos de ADN en la solución sonicada, obtenida mediante electroforesis en gel de agarosa. Los círculos representan los datos experimentales, las líneas discontinuas la descomposición en funciones gaussianas y la línea continua la superposición de éstas.

Tabla. 5.1. 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

5.3.2 Dicroísmo eléctrico reducido (DER) de soluciones de ADN sonicado

La Fig. 5.3 muestra los valores experimentales obtenidos para el DER de soluciones de ADN sonicado. Se puede observar que en todo el rango de intensidades de campo eléctrico medido el DER es negativo. El DER calculado teóricamente para cada fracción tiene una inversión de signo a campos eléctricos muy bajos, menores a 1 kV/cm aproximadamente. Si se observa los datos experimentales la curva cortaría al eje de abscisas para una intensidad de campo eléctrico del mismo orden que el teórico.

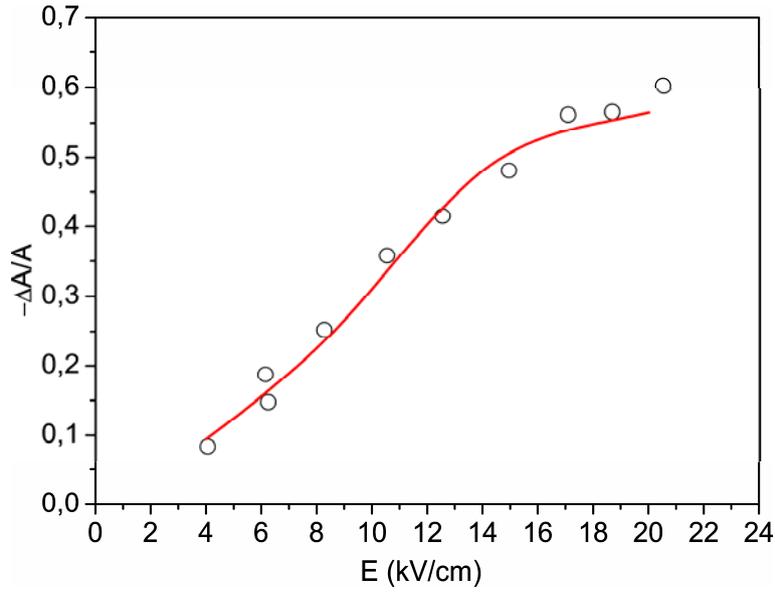


Fig. 5.3. DER de una solución acuosa de ADN sonicado de 5mg/dl en NaCl 1 mM. (○) Valores experimentales, (-) ajuste teórico.

Para realizar el ajuste teórico 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 5.1. Los fragmentos de ADN que componen una misma fracción son idénticos, siendo su longitud de cadena igual al valor medio de la función gaussiana correspondiente (Tabla 5.1). El DER de la solución se expresa como el promedio ponderado del DER correspondiente a cada fracción

$$\frac{\Delta A}{A} = \sum_{i=1}^5 n_i \left(\frac{\Delta A}{A} \right)_i \quad (5.2)$$

donde los factores n_i se calculan como el área encerrada debajo de la curva gaussiana i en la Fig. 5.1, normalizada al área encerrada debajo de la curva correspondiente a la superposición de las cinco funciones gaussianas.

Cada fracción se describió empleando el modelo MTA con un ángulo de *bending* $2\gamma_0$ diferente para cada una de ellas. Los valores de los cinco ángulos de *bending* se estimaron de manera que para cada MTA la distancia extremo a extremo d sea igual a la raíz cuadrada de la distancia extremo a extremo cuadrática media $\langle d^2 \rangle$. Esta última se expresa en función de la longitud de cadena L y de la longitud de persistencia P mediante la siguiente relación obtenida por Kratky y Porod³⁶

$$\langle d^2 \rangle = 2PL \left(1 - \frac{P}{L} + \frac{P}{L} e^{-L/P} \right) \quad (5.3)$$

El ángulo de *bending* se expresa en función de las características geométricas del MTA en la forma

$$2\gamma_0 = \frac{L}{d} \sqrt{2(1 - \cos 2\gamma_0)} \quad (5.4)$$

donde, como se mencionó anteriormente, la distancia d viene dada por la raíz cuadrada de la Ec.(5.3).

Los parámetros hidrodinámicos de las moléculas se calcularon mediante el software Hydro++³².

El ajuste de los datos experimentales se llevó a cabo resolviendo numéricamente la ecuación de Fokker-Planck para conocer la función de distribución orientacional, integrando la Ec.(2.14) para calcular la contribución $(\Delta A / A)_i$ de cada fracción y realizando el promedio de las diferentes contribuciones mediante la Ec.(5.2). Los ajustes se hicieron considerando como parámetros a la constante de polarizabilidad eléctrica K y al factor de carga efectiva n . Éste último se define de manera que multiplicado por la carga eléctrica Q de un fragmento de ADN completamente ionizado da la carga eléctrica efectiva del macroión. Las determinaciones de estos parámetros producto del ajuste fueron $K = 3 \times 10^{-17} F$ y $n = 0.14$. El ajuste teórico se muestra en la Fig. 5.3.

5.4 Conclusiones del capítulo

Los desarrollos teóricos y los procedimientos de cálculo numérico para el dichroísmo eléctrico presentados en los capítulos 2 y 3 permiten ajustar relativamente bien los resultados experimentales de soluciones de ADN sonicado. A tal efecto, es necesario tener en cuenta que las muestras presentan un alto grado de polidispersión que puede incluirse en el análisis teórico describiendo a la solución como una mezcla de fracciones de diferentes tamaños.

Es cuestionable que usemos el MTA para modelar a todos los fragmentos de la solución de ADN sonicado, dado que los resultados obtenidos con técnicas de electroforesis muestran que algunos de ellos son relativamente grandes, comparados con la longitud de persistencia. Sin embargo, se elige el MTA para describir a toda la muestra en virtud de la simplicidad de este modelo.

Actividades experimentales futuras deberían estar dirigidas a la implementación de técnicas de separación de los fragmentos de ADN sonicado por tamaños. Esto se podría realizar aplicando técnicas de precipitación con acetona³⁷ y utilizando columnas de cromatografía de filtrado en gel³⁸. De esta manera, se podría disponer de soluciones próximas

a la monodispersión y se podrían realizar las experiencias de difracción eléctrica con las fracciones más pequeñas. Esto permitiría disponer de fragmentos de ADN con longitudes de cadena de hasta 1000 Å aproximadamente, lo que haría más precisa la descripción teórica con el modelo de arco.

PROPIEDADES ÓPTICAS DE FRAGMENTOS DE ADN CON DIMENSIONES COMPARABLES A LA LONGITUD DE ONDA

6.1 Introducción

En los capítulos anteriores se estudiaron la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN en solución. Se presentaron expresiones analíticas para la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos deducidas considerando que las moléculas, en cuanto a sus propiedades ópticas se refieren, son partículas puntuales. Tal aproximación, que es de uso habitual, omite la inhomogeneidad del campo eléctrico la luz a través de las moléculas, así como las interacciones intramoleculares. En este capítulo se estudiarán las consecuencias de eliminar la aproximación de partícula puntual y se incorporarán los dos efectos antes mencionados.

El presente análisis se basa en la aproximación de dipolos discretos¹⁶ (ADD) para describir las propiedades ópticas de los fragmentos de ADN. Básicamente, la ADD describe las propiedades ópticas de las moléculas mediante un conjunto de osciladores electrónicos acoplados entre sí, a los que se asignan una polarizabilidad óptica compleja, dependiente de la frecuencia, que representa las diferentes transiciones electrónicas en las moléculas.

Se deducen expresiones para la birrefringencia eléctrica en función de la polarizabilidad óptica de los osciladores a longitud de onda visible. Esta se obtiene a partir de datos experimentales de la birrefringencia eléctrica de saturación y del incremento del índice de refracción de la solución con respecto al del solvente. Además, se analiza la contribución de las diferentes bandas de absorción a la birrefringencia eléctrica utilizando las relaciones de Kronig-Kramers.

6.2 Modelo molecular

A diferencia de los capítulos anteriores aquí emplearemos el modelo de macroión tipo varilla quebrada (MTVQ) para describir a los fragmentos de ADN. Este modelo se compone

de dos ramas cilíndricas de longitud $L/2$ que forman un ángulo β entre sí. El MTVQ se dispone en el plano $X'Z'$ del SC como se muestra en la Fig. 6.1. Este modelo incluye como un caso especial ($\beta = 180^\circ$) al modelo de macroión tipo varilla recta (MTVR). No obstante, a menos que se indique lo contrario en este capítulo nos referiremos siempre al modelo MTVQ ($\beta \neq 180^\circ$).

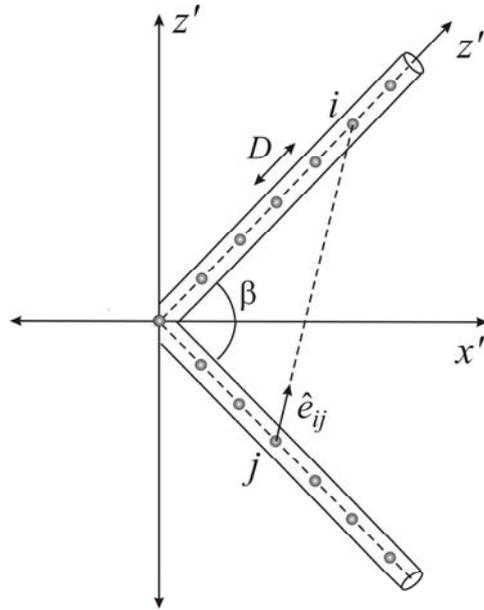


Fig. 6.1. Modelo de macroión tipo varilla quebrada

En el presente capítulo describiremos las propiedades ópticas del MTVQ mediante un conjunto de M osciladores electrónicos que interactúan entre sí y con el haz de luz incidente. Los osciladores se disponen a lo largo de cada rama del MTVQ con una separación D entre osciladores adyacentes (Fig. 6.1). Consideremos un oscilador sobre la rama superior del MTVQ. Un sistema de ejes $X''Y''Z''$ elegido con su eje Z'' coincidente con el eje de simetría de la rama superior constituye el sistema de ejes principales para este oscilador. En tal sistema, la polarizabilidad óptica del oscilador viene dada por un tensor diagonal

$$[\alpha^o] = \begin{bmatrix} \alpha_{\perp}^o & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{\perp}^o & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{\parallel}^o \end{bmatrix} \quad (6.1)$$

donde α_{\parallel}^o y α_{\perp}^o son las componentes del tensor polarizabilidad óptica según las direcciones paralela y perpendicular al eje de la hélice de ADN, respectivamente. En el SC el tensor polarizabilidad óptica de cualquier oscilador que pertenece a la rama superior viene dado por

$$[\alpha_{up}^o] = \begin{bmatrix} \alpha_{//}^o \cos^2(\beta/2) + \alpha_{\perp}^o \sin^2(\beta/2) & 0 & \sin(\beta/2)\cos(\beta/2)(\alpha_{//}^o - \alpha_{\perp}^o) \\ 0 & \alpha_{\perp}^o & 0 \\ \sin(\beta/2)\cos(\beta/2)(\alpha_{//}^o - \alpha_{\perp}^o) & 0 & \alpha_{//}^o \sin^2(\beta/2) + \alpha_{\perp}^o \cos^2(\beta/2) \end{bmatrix} \quad (6.2)$$

De manera similar, el tensor polarizabilidad óptica de un oscilador que pertenece a la rama inferior resulta

$$[\alpha_{low}^o] = \begin{bmatrix} \alpha_{//}^o \cos^2(\beta/2) + \alpha_{\perp}^o \sin^2(\beta/2) & 0 & -\sin(\beta/2)\cos(\beta/2)(\alpha_{//}^o - \alpha_{\perp}^o) \\ 0 & \alpha_{\perp}^o & 0 \\ -\sin(\beta/2)\cos(\beta/2)(\alpha_{//}^o - \alpha_{\perp}^o) & 0 & \alpha_{//}^o \sin^2(\beta/2) + \alpha_{\perp}^o \cos^2(\beta/2) \end{bmatrix} \quad (6.3)$$

6.3 Interacción de la luz con las moléculas

6.3.1 Descripción general

Consideremos una solución de fragmentos de ADN en presencia de un campo eléctrico externo. Además, consideremos que un haz de luz plano-polarizado, que se propaga en dirección perpendicular al campo eléctrico, incide sobre la solución. Sea XYZ el sistema de coordenadas del laboratorio elegido con sus ejes X y Z coincidentes con la dirección de propagación del haz de luz y del campo eléctrico externo, respectivamente. La situación se corresponde con la planteada en la sección 1.3. Sin embargo, dado que en el presente capítulo deseamos incluir los efectos de retardo de la luz incidente a través de las moléculas no omitiremos la fase espacial en el vector campo eléctrico de la luz, el que expresaremos en notación compleja de la siguiente manera

$$\mathbf{E}(x) = \begin{bmatrix} 0 \\ E_{oy} \exp(-in_y \omega x/c) \\ E_{oz} \exp(-in_z \omega x/c) \end{bmatrix} \quad (6.4)$$

donde ω es la frecuencia angular de la luz y c la velocidad de la luz en el vacío.

Hay una diferencia importante entre el análisis desarrollado en la sección 1.3 y el presente. En aquella sección se consideró que las magnitudes físicas, tales como los índices de refracción, permitividad, y otros, podían representarse adecuadamente como cantidades reales, mientras que aquí las consideraremos complejas. Esto posibilita tratar tanto con el retardo óptico, que se asocia con la parte real del índice de refracción complejo, como con la absorción de luz, que se asocia con la parte imaginaria del mismo. En la sección 1.4 la absorción y el dicroísmo se trataron en base a la teoría cuántica de la absorción. Aquí, la absorción y el retardo óptico se estructuran en forma conjunta dentro de la misma teoría

clásica.

Al igual que el campo eléctrico el vector polarización también se expresa en forma compleja como sigue

$$\mathbf{P}(x) = \begin{bmatrix} 0 \\ P_{oy} \exp(-in_y \omega x/c) \\ P_{oz} \exp(-in_z \omega x/c) \end{bmatrix} \quad (6.5)$$

donde P_{oy} y P_{oz} son amplitudes independientes de x .

El vínculo entre los vectores \mathbf{P} y \mathbf{E} sigue dado por la relación $\mathbf{P} = \varepsilon_o [\bar{\chi}] \mathbf{E}^*$, pero ahora $[\bar{\chi}]$ es un tensor complejo. Las componentes principales de $[\bar{\chi}]$ se relacionan con los índices de refracción n_y y n_z de la solución, ahora complejos, por la siguiente relación análoga a Ec.(1.2)

$$n_k^2 = 1 + \bar{\chi}_{kk} \quad k = y, z \quad (6.6)$$

6.3.2 Análisis microscópico de la polarización

En esta sección se realiza un análisis microscópico del proceso de polarización inducido en la solución por el campo eléctrico de la luz incidente. El análisis se basa en la utilización de la ADD para describir las propiedades ópticas de los fragmentos de ADN mediante un conjunto de osciladores como se describió en la sección 6.2. El campo eléctrico sobre el oscilador i de una molécula se obtiene adicionando al campo eléctrico de la luz incidente el campo eléctrico de los otros osciladores en la molécula y el campo eléctrico de las moléculas distantes tratadas como un continuo mediante la aproximación de Lorentz-Lorenz²⁰. El momento dipolar eléctrico inducido en el oscilador i viene dado por

$$\boldsymbol{\mu}_i = ([R]^{-1} [\alpha_i^o] [R]) \left[\mathbf{E}(x_i) + \frac{1}{3\varepsilon_o} \mathbf{P}(x_i) - \sum_j ([R]^{-1} [T_{ij}] [R]) \boldsymbol{\mu}_j \right] \quad (6.7)$$

donde $[R]^{-1}$ es la matriz de transformación de Euler del SC al SL y $[T_{ij}]$ es el tensor de interacción dipolar entre los dipolos i y j en el SC

$$[T_{ij}] = \frac{1}{4\pi\varepsilon_o} \left[k^2 ([I] - \mathbf{e}_{ij} \mathbf{e}_{ij}^t) \frac{1}{r_{ij}} - ([I] - 3\mathbf{e}_{ij} \mathbf{e}_{ij}^t) \left(\frac{1}{r_{ij}^3} - \frac{ik}{r_{ij}^2} \right) \right] \exp[ikr_{ij}] \quad (6.8)$$

* Se recuerda que utilizaremos una barra superior para referir a un tensor con respecto al sistema del laboratorio.

En la última ecuación \mathbf{e}_{ij} es un vector unitario dirigido desde la posición del dipolo j a la posición del dipolo i , r_{ij} es la distancia entre ellos, y k es el vector de onda en el medio. Es conveniente mencionar que hemos representado \mathbf{e}_{ij} mediante una matriz columna. Por lo tanto, el producto $\mathbf{e}_{ij}\mathbf{e}_{ij}^t$ presente en la última ecuación está dado por una matriz de dimensión 3×3 .

Resolviendo la Ec.(6.7) para $\boldsymbol{\mu}_i$ se obtiene

$$\boldsymbol{\mu}_i = \sum_j \left([R]^{-1} [A_{ij}] [R] \right) \left[\mathbf{E}(x_j) + \frac{1}{3\epsilon_0} \mathbf{P}(x_j) \right] \quad (6.9)$$

donde $[A_{ij}]$, con $i, j = 1, 2, \dots, M$, son bloques de dimensión 3×3 de la hipermatriz $[A]$ dada por

$$\begin{bmatrix} [A_{11}] & [A_{12}] & \cdots & [A_{1M}] \\ [A_{21}] & [A_{22}] & \cdots & [A_{2M}] \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ [A_{M1}] & [A_{M2}] & \cdots & [A_{MM}] \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} [B_{11}] & [B_{12}] & \cdots & [B_{1M}] \\ [B_{21}] & [B_{22}] & \cdots & [B_{2M}] \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ [B_{M1}] & [B_{M2}] & \cdots & [B_{MM}] \end{bmatrix}^{-1} \quad (6.10)$$

siendo

$$[B_{ij}] = \delta_{ij} [\alpha_i^o]^{-1} + [T_{ij}] \quad (6.11)$$

Los momentos dipolares dados por la Ec.(6.9) están directamente relacionados con la expresión microscópica del vector polarización. En otras palabras, ellos se relacionan con el momento dipolar eléctrico por unidad de volumen promediado sobre un volumen macroscópicamente pequeño V_m pero que contiene un número grande de moléculas. La expresión microscópica de \mathbf{P} debe ser compatible con la Ec.(6.5), es decir que debe llevar a amplitudes independientes de x multiplicadas por los correspondientes factores de fase. Utilizamos la misma expresión microscópica de \mathbf{P} empleada por DeVoe¹² extendida a sistemas anisotrópicos

$$\mathbf{P}(x) = \frac{N_m}{V_m} \sum_i \left\langle \begin{bmatrix} 0 \\ \mu_{iy} \exp[-in_y \omega(x-x_i)/c] \\ \mu_{iz} \exp[-in_z \omega(x-x_i)/c] \end{bmatrix} \right\rangle \quad (6.12)$$

donde N_m es el número de moléculas en el volumen V_m , μ_{iy} y μ_{iz} son las componentes del momento dipolar eléctrico $\boldsymbol{\mu}_i$ inducido sobre el oscilador i , x_i la coordenadas x de este

oscilador, y donde la suma se extiende sobre todos los osciladores en una molécula. Los corchetes angulares significan promedio sobre todas las orientaciones.

En el caso de soluciones es necesario considerar las contribuciones del soluto y del solvente a la polarización del sistema. Utilizando las Ecs.(6.9) y (6.12) el vector polarización resulta

$$\mathbf{P}(x) = \left[N_s \langle \bar{\alpha}_s^o \rangle [I] + N \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle \right] \left[\mathbf{E}(x) + \frac{1}{3\epsilon_o} \mathbf{P}(x) \right] \quad (6.13)$$

donde N_s y N son el número de moléculas del solvente y del soluto por unidad de volumen respectivamente, $\langle \bar{\alpha}_s^o \rangle [I]$, siendo $[I]$ la matriz identidad, es el tensor polarizabilidad óptica promedio de una molécula del solvente (que suponemos isotrópico y transparente) y $\langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle$ es el tensor polarizabilidad óptica promedio de una molécula del soluto cuyas componentes están definidas de la siguiente manera

$$\langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{kl} = \delta_{kl} \sum_{i,j} \langle (R^{-1}[A_{ij}]R)_{kl} \exp[-in_s \omega(x_j - x_i)/c] \rangle \quad k, l = x, y, z \quad (6.14)$$

donde hemos aproximado los índices de refracción de la solución con el índice de refracción del solvente n_s en el argumento de la exponencial compleja. La delta de Krönecker δ_{kl} se incluye porque los cálculos numéricos demuestran que los elementos no diagonales de $\langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle$ son despreciables respecto de los diagonales, al menos para los casos analizados en el presente trabajo. Esto es consistente con que el tensor susceptibilidad eléctrica en el SL sea diagonal.

Resolviendo la Ec.(6.13) para la polarización y utilizando las relaciones $\mathbf{P} = \epsilon_o [\bar{\chi}] \mathbf{E}$ y $n_k^2 = 1 + \bar{\chi}_{kk}$ se encuentra que los índices de refracción de la solución satisfacen la siguiente relación

$$\frac{n_k^2 - 1}{n_k^2 + 2} = \frac{1}{3\epsilon_o} \left(N_s \langle \bar{\alpha}_s^o \rangle + N \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{kk} \right) \quad (6.15)$$

Separando los índices de refracción de la solución en sus partes real e imaginaria de acuerdo a $n = n_{rk} + i n_{ik}$, y como para soluciones diluidas $n_{ik} \ll n_{rk}$, las partes real e imaginaria de la Ec.(6.15) resultan

$$\frac{n_{rk}^2 - 1}{n_{rk}^2 + 2} = \frac{1}{3\epsilon_o} \left(N_s \langle \bar{\alpha}_s^o \rangle + N \operatorname{Re} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{kk} \right) \quad (6.16)$$

$$n_{ik} = \frac{N}{2\epsilon_o} A(\lambda) \operatorname{Im} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{kk} \quad (6.17)$$

donde $A(\lambda) = (n_s^2 + 2)^2 / (9n_s)$ es un factor de campo interno o coeficiente ambiental dependiente del índice de refracción del solvente n_s .

6.4 Birrefringencia eléctrica

La birrefringencia eléctrica puede expresarse en función de las propiedades microscópicas de las moléculas aplicando la Ec.(6.16) según las direcciones paralela y perpendicular al eje óptico

$$\frac{n_{rz}^2 - 1}{n_{rz}^2 + 2} - \frac{n_{ry}^2 - 1}{n_{ry}^2 + 2} = \frac{N}{3\epsilon_o} \left(\operatorname{Re} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{zz} - \operatorname{Re} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{yy} \right) \quad (6.18)$$

Realizando la aproximación $(n_{rz}^2 + 2)(n_{ry}^2 + 2) \cong (n_s^2 + 2)^2$, válida para soluciones diluidas, se obtiene la siguiente expresión para la birrefringencia eléctrica

$$\Delta n_r = \frac{N}{2\epsilon_o} A(\lambda) \left(\operatorname{Re} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{zz} - \operatorname{Re} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{yy} \right) \quad (6.19)$$

6.5 Absorción de luz y polarizabilidad óptica

Caracterizaremos la absorción de la solución en ausencia de campo eléctrico externo mediante el coeficiente de extinción molar. Debido a la influencia de los movimientos térmicos este caso corresponde a una solución de moléculas aleatoriamente orientadas y, por lo tanto, a una solución ópticamente isotrópica con un solo índice de refracción cuya parte imaginaria está dada por

$$n_i = \frac{N}{2\epsilon_o} A(\lambda) \operatorname{Im} \langle \bar{\alpha}_m^o \rangle \quad (6.20)$$

donde utilizamos la nomenclatura $\operatorname{Im} \langle \bar{\alpha}_m^o \rangle$ para representar cualquiera de los elementos $\operatorname{Im} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{yy}$ o $\operatorname{Im} \langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle_{zz}$ porque éstos son iguales para orientación aleatoria.

Utilizando la ley de Lambert-Beer²¹ podemos relacionar el coeficiente de extinción molar

por mol de molécula $\gamma(\lambda)$ con la parte imaginaria del índice refracción de la siguiente manera

$$\gamma(\lambda) = -\frac{4\pi N_A}{2.3\lambda N} n_i \quad (6.21)$$

Reemplazando la Ec.(6.20) en la Ec.(6.21) el coeficiente de extinción molar resulta

$$\gamma(\lambda) = -\frac{2\pi N_A}{2.3\lambda\epsilon_o} A(\lambda) \text{Im}\langle\bar{\alpha}_m^o\rangle \quad (6.22)$$

La Ec.(6.22) es útil para determinar la polarizabilidad óptica imaginaria de cada oscilador a partir de datos experimentales del espectro de absorción del ADN. Hecho esto se puede determinar la polarizabilidad óptica real de cada oscilador aplicando la siguiente relación de Kronig-Kramers²⁰

$$\text{Re}\alpha^o(\lambda) = -\frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{\text{Im}\alpha^o(\lambda')}{\lambda' [1 - (\lambda'/\lambda)^2]} d\lambda' \quad (6.23)$$

donde la letra P significa el valor principal de la integral. La última relación se aplica a cada uno de los elementos del tensor polarizabilidad óptica.

6.6 Incremento del índice de refracción de la solución con respecto al del solvente

Consideremos nuevamente un haz de luz que incide sobre una solución de moléculas de ADN en ausencia de un campo eléctrico externo. Debido a la orientación aleatoria de las moléculas, la solución se caracteriza por un solo índice de refracción cuya parte real n_r satisface

$$\frac{n_r^2 - 1}{n_r^2 + 2} = \frac{1}{3\epsilon_o} (N_s \langle\bar{\alpha}_s^o\rangle + N \text{Re}\langle\bar{\alpha}_m^o\rangle) \quad (6.24)$$

donde $\text{Re}\langle\bar{\alpha}_m^o\rangle$ es la polarizabilidad óptica real promedio de una molécula de soluto calculada para orientación aleatoria.

Para el índice de refracción del solvente tenemos una ecuación similar a la Ec.(6.24)

$$\frac{n_s^2 - 1}{n_s^2 + 2} = \frac{N_s}{3\epsilon_o} \langle\bar{\alpha}_s^o\rangle \quad (6.25)$$

Restando las Ecs.(6.24) y (6.25) y haciendo las aproximaciones $(n_r^2 + 2)(n_s^2 + 2) \cong (n_s^2 + 2)^2$

y $n_r + n_s \cong 2n_s$, válidas para soluciones diluidas, resulta

$$\delta n_r = \frac{N}{2\varepsilon_o} A(\lambda) \text{Re} \langle \bar{\alpha}_m^o \rangle \quad (6.26)$$

donde $\delta n_r = n_r - n_s$ es el incremento del índice de refracción de la solución con respecto al del solvente.

Para moléculas de ADN tipo MTRV sin considerar los efectos de retardo del campo eléctrico de la luz incidente la polarizabilidad óptica de los osciladores en la región visible se puede obtener a partir de datos experimentales de δn_r y de la birrefringencia eléctrica de saturación. En este caso particular la polarizabilidad óptica real de una molécula en el SC está representada por un tensor diagonal con elementos $\text{Re} \alpha_{m//}^o$ y $\text{Re} \alpha_{m\perp}^o$ según las direcciones paralela y perpendicular a la hélice del ADN. La polarizabilidad óptica real promedio de una molécula del soluto, promediada aleatoriamente sobre todas las orientaciones, está dada por

$$\text{Re} \langle \bar{\alpha}_m^o \rangle = \frac{1}{3} (2 \text{Re} \alpha_{m\perp}^o + \text{Re} \alpha_{m//}^o) \quad (6.27)$$

Por lo tanto, el incremento del índice de refracción de la solución con respecto al del solvente resulta

$$\delta n_r = \frac{N}{6\varepsilon_o} A(\lambda) (2 \text{Re} \alpha_{m\perp}^o + \text{Re} \alpha_{m//}^o) \quad (6.28)$$

6.7 Resultados y discusión

Todos los cálculos realizados en el presente capítulo fueron realizados en el entorno del software MATLAB 6.0. Los parámetros que caracterizan al modelo molecular empleado son:

$D = 23,8 \text{ \AA}$, $\beta = 165^\circ$ para el modelo MTVQ y $\beta = 180^\circ$ para el modelo MTRV. La dispersión del índice de refracción del agua a sido incluida utilizando valores reportados por Segelstein³⁹.

6.7.1 Polarizabilidad óptica de los osciladores a partir de datos experimentales del espectro de absorción

En esta sección se determina la polarizabilidad óptica real que se debe asignar a los osciladores para representar adecuadamente las propiedades ópticas del ADN en la región visible ($\lambda = 589 \text{ nm}$). El procedimiento para esto consiste básicamente en integrar la relación

de Kronig-Kramers dada por la Ec.(6.23) sobre todas las longitudes de onda donde la absorción del ADN es apreciable. Previamente se debe determinar el integrando de la relación de Kronig-Kramers utilizando datos experimentales del espectro de absorción del ADN. El espectro de absorción empleado en este trabajo se muestra en la Fig. 6.2. Éste ha sido medido por Yamaoka and Matsuda⁴⁰ en la región $\lambda > 215 \text{ nm}$ para fragmentos de ADN en solución acuosa. Para $\lambda < 215 \text{ nm}$ la absorción del agua comienza a ser significativa y, por lo tanto, no se encuentran datos reportados para la absorción del ADN en solución acuosa para longitudes de onda menores. Sin embargo, aquí se completó el espectro para $\lambda < 215 \text{ nm}$ con medidas realizadas por Sontag y Weibezahn⁴¹ para el ADN en film. Esto se pudo realizar porque ambos espectros presentan idéntica forma en la región $\lambda > 215 \text{ nm}$. Así, se pudo determinar un factor de escala para que ambos espectros coincidan en la región antes mencionada y utilizamos el mismo factor para completar el espectro del ADN en solución acuosa con el espectro del ADN en film para $\lambda < 215 \text{ nm}$ (Fig. 6.2).

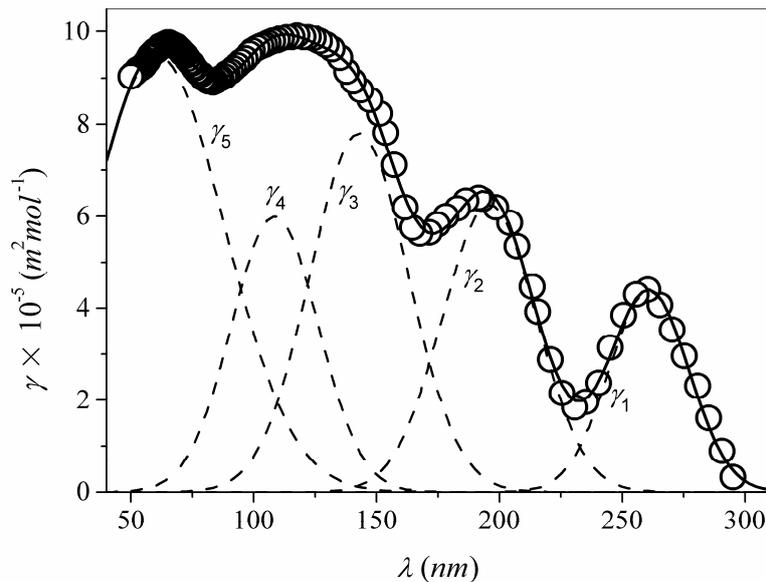


Fig. 6.2. Espectro de absorción del ADN. Los datos para $\lambda > 215 \text{ nm}$ fueron reportados por Yamaoka y Matsuda⁴⁰ para el ADN solución acuosa. Los datos para $\lambda < 215 \text{ nm}$ son proporcionales a los reportados por Sontag y Weibezahn⁴¹ para el ADN en film.

El espectro de absorción resultante se descompuso en cinco bandas de absorción, cada una de las cuales se aproximó con la función gaussiana

$$\gamma_i(\lambda) = \gamma_{oi} \exp \left[-\frac{(\lambda - \lambda_i)^2}{2\sigma_i^2} \right] \quad (6.29)$$

donde la posición del máximo λ_i , el coeficiente de extinción molar máximo γ_{oi} , y la correspondiente desviación estándar de la banda i están dados en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Descomposición del espectro de absorción del ADN en bandas gaussianas

Banda	$\lambda_i (nm)$	$\gamma_{oi} \times 10^{-5} (m^2 mol^{-1})$	$\sigma_i (nm)$
1	260,85	4,38	16,45
2	195,85	6,27	19,18
3	142,95	7,81	20,02
4	108,58	6,01	17,64
5	60,558	9,51	27,60

El tensor polarizabilidad óptica de cada oscilador se expresa según la Ec.(6.1). En esta ecuación los subíndices // y \perp son empleados para representar la anisotropía en las propiedades ópticas según las direcciones paralela y perpendicular a la dirección de la hélice del ADN, respectivamente. A fin de incluir esta anisotropía separamos las contribuciones de las cinco bandas de absorción gaussianas a la polarizabilidad óptica en dos grupos diferentes dependiendo de su origen. Las bandas de absorción 1 y 2 se asignaron al plano de las bases en forma isotrópica para representar las transiciones $\pi - \pi^*$ predominantes en este rango de longitudes de onda. Su contribución al tensor polarizabilidad óptica real se expresa de la siguiente manera

$$\text{Re}[\alpha_1^o]_{589nm} = \begin{bmatrix} \text{Re} \alpha_1^o & 0 & 0 \\ 0 & \text{Re} \alpha_1^o & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}_{589nm} \quad (6.30)$$

donde $\text{Re} \alpha_1^o(589nm)$ se calcula en base a la relación de Kronig-Kramers

$$\text{Re} \alpha_1^o(589nm) = -\frac{2}{\pi} P \int_0^{\infty} \frac{\text{Im} \alpha_1^o(\lambda')}{\lambda' [1 - (\lambda'/589nm)^2]} d\lambda' \quad (6.31)$$

La función $\text{Im} \alpha_1^o(\lambda')/\lambda'$, necesaria para la integración, se ajusta de manera que la Ec.(6.22) reproduzca los resultados experimentales de las bandas de absorción $\gamma_1(\lambda)$ y $\gamma_2(\lambda)$ para un conjunto discreto de longitudes de onda λ_i . La Fig. 6.3 muestra los valores obtenidos para $\text{Im} \alpha_1^o(\lambda_i)/\lambda_i$ y los correspondientes ajustes teóricos de la misma.

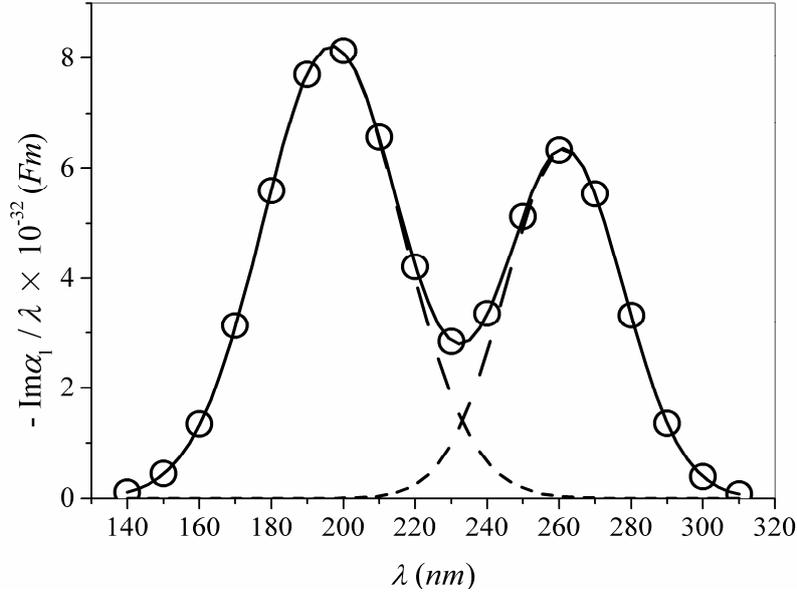


Fig. 6.3. Polarizabilidad óptica imaginaria correspondiente a las bandas gaussianas 1 y 2.

Kiseleva et al.⁴² han reportado evidencia experimental acerca de la absorción del azúcar y los grupos fosfatos para longitudes de onda menores a 160 nm. Esta absorción se incluyó considerando a las bandas de absorción $\gamma_3(\lambda)$, $\gamma_4(\lambda)$ y $\gamma_5(\lambda)$ isotrópicas en el espacio. La contribución de estas tres bandas gaussianas al tensor polarizabilidad óptica real se expresa de la siguiente manera

$$\text{Re}[\alpha_2^o]_{589nm} = \begin{bmatrix} \text{Re}\alpha_2^o & 0 & 0 \\ 0 & \text{Re}\alpha_2^o & 0 \\ 0 & 0 & \text{Re}\alpha_2^o \end{bmatrix}_{589nm} \quad (6.32)$$

donde

$$\text{Re}\alpha_2^o(589nm) = -\frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{\text{Im}\alpha_2^o(\lambda')}{\lambda' [1 - (\lambda'/589nm)^2]} d\lambda' \quad (6.33)$$

En este caso la función $\text{Im}\alpha_2^o(\lambda')/\lambda'$, necesaria para la integración, se ajusta de manera que la Ec.(6.22) reproduzca los resultados experimentales de las bandas de absorción $\gamma_3(\lambda)$, $\gamma_4(\lambda)$ y $\gamma_5(\lambda)$ para un conjunto discreto de longitudes de onda λ_i . La Fig. 6.4 muestra los valores de $\text{Im}\alpha_2^o(\lambda_i)/\lambda_i$ obtenidos y los correspondientes ajustes teóricos.

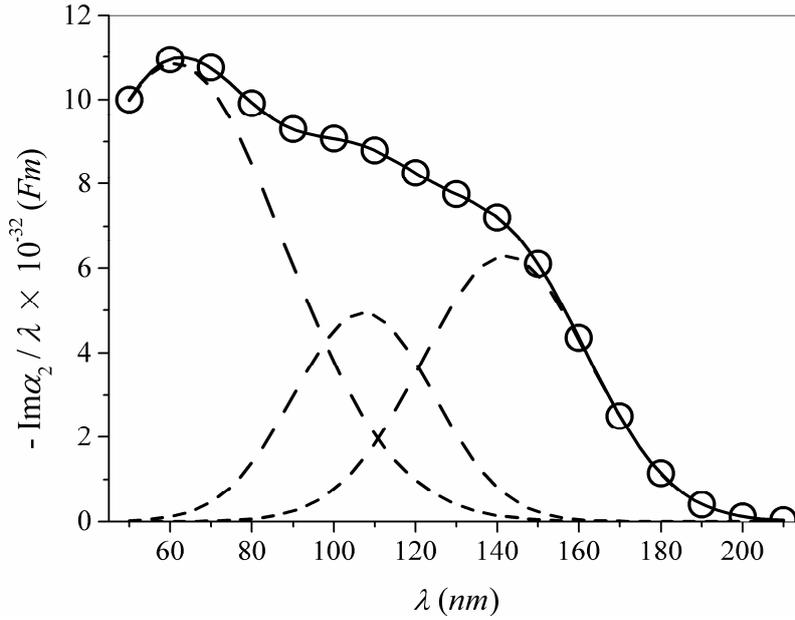


Fig. 6.4. Polarizabilidad óptica imaginaria correspondiente a las bandas gaussianas 3, 4 y 5.

La contribuciones de las bandas de absorción 1-2 y 3-4-5 a la polarizabilidad óptica real calculada mediante las Ecs.(6.31) y (6.33) son: $\text{Re}\alpha_1^o(589\text{nm})=4,89\times 10^{-39} F m^2$ y $\text{Re}\alpha_2^o(589\text{nm})=8,22\times 10^{-39} F m^2$. Para determinar la polarizabilidad óptica real según las direcciones paralela y perpendicular a la hélice del ADN se consideran ambas contribuciones sumando las Ecs.(6.30) y (6.32). De esta manera se obtienen los valores $\text{Re}\alpha_{||}^o(589\text{nm})=8,22\times 10^{-39} F m^2$ y $\text{Re}\alpha_{\perp}^o(589\text{nm})=1,31\times 10^{-38} F m^2$.

Es conveniente especificar algunos aspectos relacionados a las funciones $\text{Im}\alpha_1^o(\lambda')/\lambda'$ y $\text{Im}\alpha_2^o(\lambda')/\lambda'$ anteriormente omitidos. Para determinar tales funciones es necesario saber, al menos aproximadamente, los valores de $\text{Re}\alpha_1^o(\lambda_i)$ y $\text{Re}\alpha_2^o(\lambda_i)$ en la región de absorción. Esto se debe a que para moléculas compuestas por más de un oscilador, existe un débil acoplamiento entre las contribuciones de las partes real e imaginaria de la polarizabilidad óptica de los osciladores a la polarizabilidad óptica molecular. Para determinar en forma aproximada los valores de $\text{Re}\alpha_1^o(\lambda_i)$ y $\text{Re}\alpha_2^o(\lambda_i)$ primero suponemos que cada molécula está compuesta de un solo oscilador. En este caso, las partes real e imaginaria de la polarizabilidad óptica del oscilador se encuentran desacopladas. Entonces, la polarizabilidad óptica imaginaria del oscilador se determina utilizando la Ec.(6.22) y, posteriormente, la polarizabilidad óptica real del oscilador se estima en base a la relación de Kronig-Kramers. Finalmente, $\text{Re}\alpha_1^o(\lambda_i)$ y $\text{Re}\alpha_2^o(\lambda_i)$ para moléculas compuestas por M osciladores se estiman

dividiendo por M los valores obtenidos para moléculas compuestas por un solo oscilador.

Influencia de las interacciones y de los efectos de retardo

La Fig. 6.5 muestra la diferencia relativa porcentual entre los valores teóricos del espectro de absorción calculados incluyendo y omitiendo las interacciones entre osciladores y los efectos de retardo. La influencia combinada de ambos efectos provoca el incremento y la disminución de la absorción aproximadamente para $\lambda < 175nm$ y $\lambda > 175nm$, respectivamente. En general, la diferencia entre ambos espectros incrementa con la longitud de onda y alcanza valores de hasta el 8 %, aproximadamente.

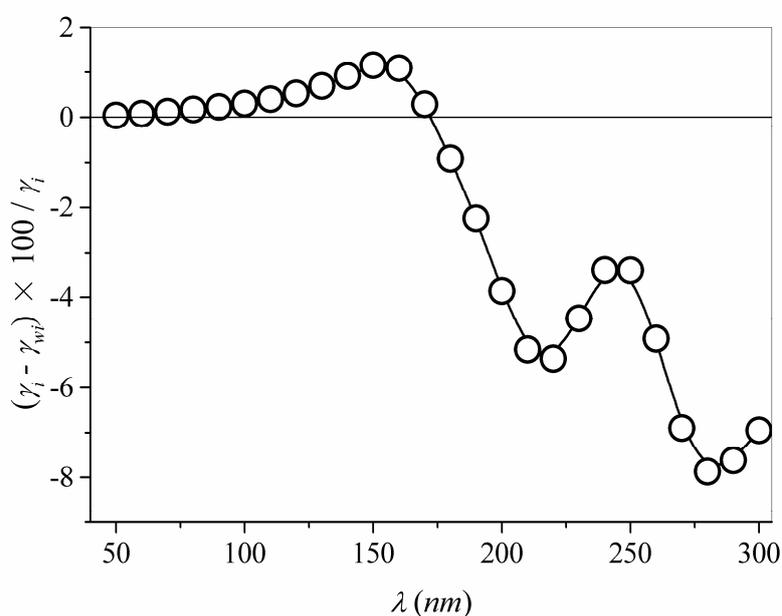


Fig. 6.5. Diferencia relativa porcentual entre los coeficientes de extinción molares $\gamma_i(\lambda)$ y $\gamma_{wi}(\lambda)$, calculados incluyendo y omitiendo las interacciones y los efectos de retardo, respectivamente.

6.7.2 Polarizabilidad óptica de los osciladores a partir de Δn_{rs} y δn_r

Se realizó una segunda estimación de la polarizabilidad óptica de los osciladores en la región visible, esta vez utilizando datos experimentales de la birrefringencia eléctrica de saturación Δn_{rs} y del incremento del índice de refracción de la solución con respecto al del solvente δn_r . Para ello se consideró el modelo MTRV ($\beta = 180^\circ$) y se omitieron los efectos de retardo de la luz incidente a través de las moléculas. Esta aproximación es necesaria para eliminar el acoplamiento entre las diferentes componentes del tensor de polarizabilidad óptica; de otra forma, las componentes no se podrían determinar independientemente una de otra.

La birrefringencia eléctrica de saturación corresponde a la orientación completa de las moléculas en la dirección del campo eléctrico aplicado. Esta puede obtenerse a partir de datos experimentales de la birrefringencia eléctrica en función del campo eléctrico aplicado y extrapolando para intensidad de campo eléctrico infinito. A partir de la Ec.(6.19) la birrefringencia eléctrica de saturación viene dada por

$$\Delta n_{rs} = \frac{N}{2\varepsilon_o} A(\lambda) (\text{Re} \alpha_{m//}^o - \text{Re} \alpha_{m\perp}^o) \quad (6.34)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones constituido por las Ec.(6.28) y Ec.(6.34) los elementos del tensor polarizabilidad óptica molecular en el SC resultan

$$\text{Re} \alpha_{m//}^o = \frac{2\varepsilon_o}{3NA(\lambda)} (3\delta n_r + 2\Delta n_{rs}) \quad (6.35)$$

y

$$\text{Re} \alpha_{m\perp}^o = \frac{2\varepsilon_o}{3NA(\lambda)} (3\delta n_r - \Delta n_{rs}) \quad (6.36)$$

Bertolotto et. al.³⁴ han reportado valores experimentales de Δn_{rs} y δn_r de soluciones de fragmentos de ADN con una longitud promedio de 1350 Å, concentración $c = 7 \text{ mg / dl}$ y luz visible ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Empleando los datos experimentales reportados por estos autores, los elementos del tensor polarizabilidad óptica molecular calculados mediante las Ecs.(6.35) y (6.36) resultan: $\text{Re} \alpha_{m//}^o = 9,11 \times 10^{-37} \text{ F m}^2$ y $\text{Re} \alpha_{m\perp}^o = 1,34 \times 10^{-36} \text{ F m}^2$. Finalmente, la polarizabilidad óptica de los osciladores en las direcciones paralela y perpendicular a la hélice de ADN se ajustan de manera que reproduzcan los valores de polarizabilidad óptica molecular recientemente calculados. De esta manera se obtuvieron los siguientes resultados: $\text{Re} \alpha_{//}^o = 1,52 \times 10^{-38} \text{ F m}^2$ y $\text{Re} \alpha_{\perp}^o = 2,45 \times 10^{-38} \text{ F m}^2$.

Si comparamos la polarizabilidad óptica real en la región visible obtenida en esta sección con aquellos obtenidos en la sección previa notaremos que los últimos son inferiores respecto a los primeros en un factor 1,85 aproximadamente. Esta diferencia puede originarse en que la relación de Kronig-Kramers se integró en un intervalo finito de longitudes de onda, omitiendo toda absorción fuera de la región ultravioleta. Por ejemplo, la absorción infrarroja del ADN no se incluyó y, aunque es relativamente poco intensa, podría tener alguna contribución. Shapiro et al.⁴³, al estudiar la luz dispersada por moléculas de ADN utilizando la ADD asignaron a cada oscilador una polarizabilidad óptica en la región de los rayos X. Sin

embargo, en este trabajo esta polarizabilidad no se ha incluido porque proviene de datos de absorción del benceno.

6.7.3 Influencia de las interacciones

En esta sección estudiamos la influencia de las interacciones intramoleculares sobre la anisotropía óptica real de las moléculas $\text{Re}\Delta\alpha_m^o = \text{Re}\alpha_{m//}^o - \text{Re}\alpha_{m\perp}^o$ empleando el modelo MTRV. Esto es equivalente a analizar la influencia de las interacciones sobre la birrefringencia eléctrica de saturación (Ec.(6.34)). En este caso los efectos de retardo no son relevantes porque en la saturación las moléculas están completamente orientadas en dirección perpendicular al haz de luz incidente. La Fig. 6.6 muestra la diferencia relativa porcentual entre los valores teóricos de $\text{Re}\Delta\alpha_m^o$ incluyendo y omitiendo las interacciones entre osciladores para MTRV con diferentes longitudes. Se observa que el efecto de las interacciones aumenta con la longitud de las moléculas hasta alcanzar un valor de saturación del 22%, aproximadamente.

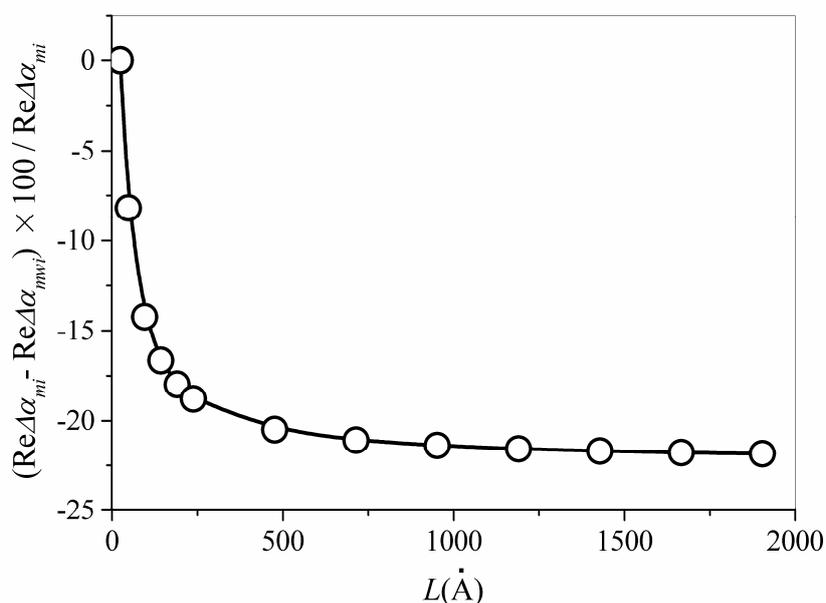


Fig. 6.6. Diferencia relativa porcentual entre las anisotropías de polarizabilidad óptica $\text{Re}\Delta\alpha_{mi}$ y $\text{Re}\Delta\alpha_{mvi}$, calculadas incluyendo y omitiendo las interacciones entre los osciladores, respectivamente.

6.7.4 Comparación con las teorías de uso habitual

La Ec.(6.19) para la birrefringencia eléctrica ha sido deducida para moléculas tipo MTVQ

de tamaño arbitrario. Esta ecuación es igual a la expresión habitual para la birrefringencia eléctrica, excepto por el factor $A(\lambda)$ que usualmente es aproximado con $1/n_s$. Sin embargo, en este caso, a diferencia de las teorías previas, ésta se dedujo sin suponer que las partículas son pequeñas respecto de la longitud de onda de la luz. El tensor $\langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle$ representa la respuesta promedio de toda una molécula a la luz incidente considerando la no homogeneidad del campo eléctrico de la luz a través de ella y las interacciones entre sus diferentes partes (Ec.(6.14)). La restricción de moléculas tipo MTVQ se debe a que el tensor $\langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle$ debe necesariamente ser diagonal para obtener la Ec.(6.19), y esto ha sido probado solamente para el modelo MTVQ. Sin embargo, dada la relación que existe entre $\langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle$ y el tensor permitividad relativa, y dado que éste último debe ser diagonal en el SL para caracterizar a la solución como un cristal uniaxial, es de esperar que $\langle [\bar{\alpha}_m^o] \rangle$ sea también un tensor diagonal para moléculas con geometrías diferentes al MTVQ.

6.8 Conclusiones del capítulo

La ADD es una técnica útil para estudiar la birrefringencia eléctrica de fragmentos de ADN tipo MTVQ con dimensiones comparables a longitud de onda de la luz. Aplicando la ADD se puede incluir la inhomogeneidad del campo eléctrico de la luz a través de las moléculas y las interacciones entre sus diferentes partes.

Para fragmentos de ADN descritos con el modelo MTVQ se obtiene la misma expresión para la birrefringencia eléctrica que surge del análisis que considera a las moléculas como puntos polarizables. Por lo tanto, la relación entre la polarizabilidad óptica de las moléculas y la birrefringencia eléctrica no se ve modificada. Sin embargo, para estudiar las contribuciones de las diferentes partes de las moléculas a la polarizabilidad óptica molecular y a la birrefringencia eléctrica es importante incluir los efectos de retardo y las interacciones intramoleculares. Para fragmentos de ADN con dimensiones comparables a la longitud de onda de la luz las propiedades ópticas moleculares son afectadas por las interacciones intramoleculares y los efectos de retardo en hasta el 22%, aproximadamente.

El presente estudio, desarrollado para el modelo MTVQ, es de esperar que sea generalizable a otros modelos con diferentes geometrías, aunque se debe mencionar que esto no ha sido demostrado en el presente trabajo.

Finalmente, es interesante observar que los efectos relacionados con el tamaño finito de las moléculas afectan al espectro de absorción del ADN en hasta el 8%, aproximadamente. Es

posible inferir entonces que estos efectos tienen su influencia también sobre el dicroísmo eléctrico del ADN.

ORIENTACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN UN CAMPO ELÉCTRICO. UN ESTUDIO MEDIANTE SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

7.1 Introducción

En el capítulo 3 se estudió la orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico externo por métodos teóricos. Básicamente, se planteó la ecuación de Fokker-Planck del sistema y se procedió a su resolución mediante métodos numéricos. Como resultado de resolver tal ecuación se pudo conocer la función de distribución orientacional de fragmentos de ADN descritos con el modelo MTA. Realmente, la ecuación de Fokker-Planck aplicada al problema de interés constituye una ecuación diferencial no fácilmente resoluble, aún para el modelo molecular simple allí utilizado. Es de esperar que se presenten dificultades mayores si deseáramos incorporar en el modelo algunos aspectos hasta ahora omitidos, como por ejemplo la flexibilidad de las moléculas.

Actualmente, la simulación computacional ofrece una herramienta de estudio que permite incluir aspectos de difícil implementación en los análisis teóricos. El objetivo general del presente capítulo es desarrollar un modelo simple para describir fragmentos de ADN que permita estudiar su orientación en un campo eléctrico mediante simulación computacional. La técnica de simulación elegida es denominada dinámica de Langevin⁴⁴. La elección se realizó en virtud de la relativamente baja capacidad de cálculo computacional requerida por dicha técnica, en relación a otras como la dinámica molecular. Esto se debe a que en la simulación dinámica de Langevin no se incluye al solvente de manera explícita.

El tiempo que demanda la orientación de fragmentos de ADN con dimensiones de interés para las técnicas electro-ópticas requiere simular al sistema durante tiempos de evolución muy largos, que pueden alcanzar el orden de los microsegundos. Es por ello que se hace énfasis en que el modelo implementado sea suficientemente simple como para reducir los costos computacionales; por supuesto, sin descuidar que describa adecuadamente ciertos aspectos

del sistema relevantes para nuestro problema. En el presente trabajo se describe a los fragmentos de ADN con un modelo molecular constituido por un conjunto de subunidades esféricas unidas en sí mediante potenciales elásticos. Se incorporan también iones Na^+ en forma explícita.

Se analizan las características elásticas y eléctricas del modelo implementado. Además, se introduce una función de orientación que permite describir el grado orientacional de los fragmentos en un campo eléctrico. Se analizan los cambios de la función de orientación en el estado estacionario con la intensidad del campo eléctrico.

7.2 Simulación dinámica de Langevin

En simulación dinámica de Langevin se calcula la evolución temporal de un sistema de N partículas Brownianas, cada una de las cuales satisface la ecuación de movimiento de Langevin en un campo de fuerzas

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} - \xi_i \frac{d\mathbf{r}_i}{dt} + \frac{\mathbf{R}_i(t)}{m_i} \quad (7.1)$$

\mathbf{F}_i es la fuerza sobre la i -ésima partícula debido a su interacción con las otras partículas del sistema explícitamente incluidas y a los posibles agentes externos. Los dos últimos términos del segundo miembro en la Ec.(7.1) representan el efecto del solvente sobre las partículas. El primero de estos dos términos es una fuerza de fricción proporcional a la velocidad que se opone al movimiento. El segundo es una fuerza aleatoria, cuyo promedio temporal es nulo, que se origina en las muchas colisiones aleatorias con las moléculas del solvente. La fuerza aleatoria satisface la relación de correlación $\langle \mathbf{R}_i(t) \mathbf{R}_j(t+s) \rangle = 2m_i \xi_i k_B T \delta(s) \delta_{ij}$.⁴⁵

Las ecuaciones de movimiento para el sistema de partículas deben resolverse numéricamente en pasos pequeños. En este trabajo esto se realiza empleando el paquete de simulación GROMACS⁴⁵.

El coeficiente de proporcionalidad ξ_i entre la fuerza de fricción y la velocidad es denominado coeficiente de fricción de la partícula. Considerando partículas esféricas este coeficiente viene dado según la ley de Stokes por

$$\xi_i = \frac{6\pi\eta R_i}{m_i} \quad (7.2)$$

donde R_i y m_i son el radio hidrodinámico y la masa de la partícula i respectivamente, y η la

viscosidad del solvente.

El coeficiente de fricción ξ_i puede relacionarse con el coeficiente de difusión D_i mediante la relación de Einstein

$$\xi_i = \frac{k_B T}{m_i D_i} \quad (7.3)$$

7.3 Modelo

En este trabajo describimos un fragmento de ADN mediante una cadena lineal de 21 subunidades esféricas de igual radio $R = 12 \text{ \AA}$. De esta manera, cada subunidad representa aproximadamente 7 pb de la cadena de ADN. Cada subunidad se conecta con sus vecinas inmediatas mediante una fuerza elástica que derivada del potencial armónico

$$V_b(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (7.4)$$

donde la separación de equilibrio b_{ij} y la constante elástica k_{ij}^b son las mismas para todas las interacciones i, j . Los valores utilizados para estos parámetros son $b_{ij} = 2R$ y $k_{ij}^b = 400k_B T / b_{ij}^2$, respectivamente. El valor utilizado para la constante elástica es del orden de aquel utilizado por García de la Torre et al.⁴⁶.

Se incorporan también potenciales armónicos para restringir el ángulo conformado por dos conectores sucesivos que unen tres esferas consecutivas en la cadena

$$V_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^a (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^o)^2 \quad (7.5)$$

donde al ángulo de equilibrio y a la constante elástica se le asignaron los valores $\theta_{ijk}^o = 180^\circ$ y $k_{ijk}^a = Pk_B T / b_{ij}^2$ respectivamente, siendo P la longitud de persistencia aquí considerada igual a 500 \AA . Estos valores son los mismos para todas las interacciones i, j, k .

Los efectos de volumen excluido, esto es las interacciones no electrostáticas entre esferas no enlazadas (o no directamente) que previene el solapamiento instantáneo entre ellas, se describen mediante un potencial de Lennard-Jones

$$V_{LJ} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (7.6)$$

donde se utilizó $\varepsilon_{ee} = 5k_B T$ y $\sigma_{ee} = 2R/\sqrt{2}$ para las interacciones entre esferas del ADN, y los parámetros correspondientes al campo de fuerzas ffgmx del paquete GROMACS⁴⁵ para los iones Na^+ . Los parámetros de Lennard-Jones para las interacciones i, j con $i \neq j$ se asignaron en base a las combinaciones $\sigma_{ij} = (\sigma_i + \sigma_j)/2$ y $\varepsilon_{ij} = (\varepsilon_i \varepsilon_j)^{1/2}$.

La interacción eléctrica se expresa mediante el potencial coulombiano para las interacciones esfera-esfera*, esfera-ión e ión- ión.

$$V_C(r_{ij}) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_o\kappa} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (7.7)$$

La carga eléctrica asignada a cada subunidad esférica del soluto es $q = 10e$, donde e es la carga eléctrica del electrón. Este valor es aproximadamente el 70 % de la carga eléctrica del fragmento de cadena de ADN que la esfera representa cuando todos sus grupos fosfatos están ionizados. A la constante dieléctrica relativa del agua se asigna el valor $\kappa = 80,2$.

El coeficiente de fricción de las esferas de la cadena de ADN se estimó utilizando la Ec.(7.2), mientras que para los iones Na^+ se empleó la Ec.(7.3) en combinación con el valor experimental $1,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 / \text{s}$ para el coeficiente de difusión de los mismos.

7.4 Cálculo y análisis de resultados

7.4.1 Procedimiento de simulación

Como se mencionara anteriormente, todas las simulaciones se realizaron empleando el paquete de simulación GROMACS⁴⁵.

Se utilizó una caja de simulación cúbica de 549,6 Å de arista y se aplicaron condiciones de contorno periódicas. Todas las interacciones se calcularon explícitamente dentro de un radio de corte de 200 Å. El paso de tiempo de simulación fue de 4 fs y los datos se grabaron cada 4 ps. El procedimiento para las simulaciones fue el siguiente:

- El soluto se dispuso con su eje largo paralelo al eje Y de la caja de simulación. El centro de masa del soluto coincide inicialmente con el centro de la caja de simulación. A fin de

* A menudo, siempre que no haya lugar a confusión, emplearemos el término esfera para referirnos únicamente a una subunidad esférica de la cadena de ADN. Hacemos salvedad porque los iones son también descriptos como partículas esféricas.

neutralizar al sistema se incluyeron 210 iones Na^+ , distribuidos inicialmente en posiciones aleatorias. Se dejó evolucionar al sistema durante un período de 100 ns .

- A continuación se realizaron una serie de simulaciones con y sin campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico utilizado es estático, homogéneo y su dirección coincide con la del eje Z de la caja de simulación. La evolución temporal de estas simulaciones es de entre $7\mu\text{s}$ y $17\mu\text{s}$, dependiendo de la intensidad del campo eléctrico aplicado.

7.4.2 Análisis de flexibilidad de las moléculas

A fin de analizar la flexibilidad del modelo se calculó la distancia extremo a extremo d , definida ésta como la distancia entre los centros de las esferas situadas en los extremos de la cadena. Los resultados muestran que sin campo eléctrico la distancia extremo a extremo presenta poca variación en el tiempo (Fig. 7.1). El valor medio calculado sobre un intervalo de tiempo igual a $5\mu\text{s}$ es 483 \AA , siendo la fluctuación igual a 8 \AA . Este valor es algo menor a 504 \AA , que es la longitud de contorno. En el rango de intensidades de campo eléctrico utilizado en las simulaciones, que es de hasta $E = 30\text{ kV/cm}$, la distancia extremo a extremo no presenta cambios sustanciales (Fig. 7.1). El valor máximo de intensidad de campo eléctrico aquí analizado, $E = 30\text{ kV/cm}$, es superior al límite habitualmente utilizado en las experiencias electro-ópticas, por lo que intensidades mayores a ésta no serían prácticas experimentalmente.

La flexibilidad del modelo se analizó también en base al ángulo ζ comprendido entre los segmentos que unen las esferas 1- 11 y 11-21, siendo las esferas 1 y 21 las correspondientes a los extremos del ADN y 11 la esfera central. Al igual que la distancia extremo a extremo, el ángulo ζ en ausencia de campo eléctrico presenta pocas variaciones en el tiempo (Fig. 7.2). Su valor medio sobre un intervalo de $5\mu\text{s}$ es igual a 170° , con una fluctuación igual a 6° . Los resultados obtenidos en presencia de un campo eléctrico de intensidad $E = 30\text{ kV/cm}$ no muestran cambios significativos en el ángulo ζ (Fig. 7.2).

El reciente análisis muestra que el modelo desarrollado es relativamente rígido y que la geometría de la molécula no presenta sustanciales cambios en presencia de campos eléctricos con intensidades de hasta $E = 30\text{ kV/cm}$. Bajo la acción conjunta de los potenciales de interacción implementados la molécula presenta un ligero arqueamiento sin diferir demasiado de lo que sería un polielectrolito cilíndrico. Este comportamiento es adecuado para describir

fragmentos de ADN con longitudes de cadena aproximadamente igual a su longitud de persistencia.

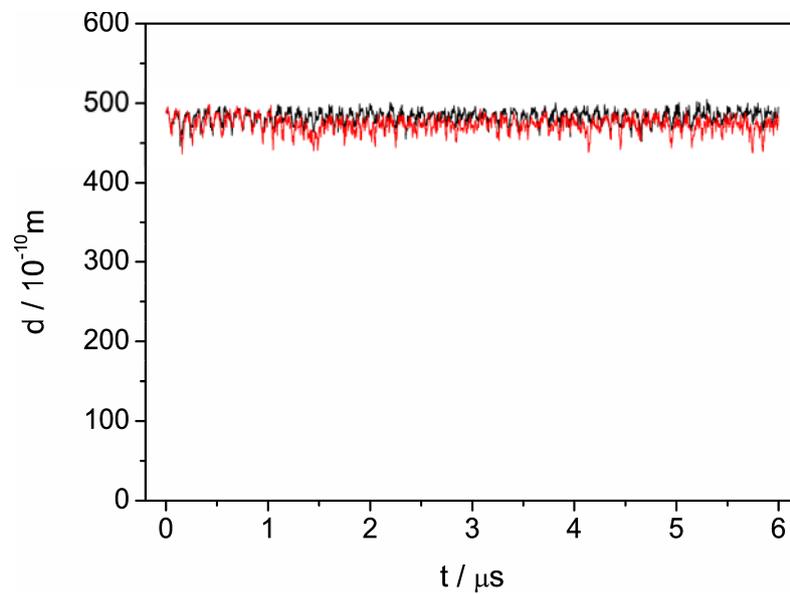


Fig. 7.1. Distancia extremo a extremo en función del tiempo para diferentes intensidades de campo eléctrico aplicado. (-) $E = 0 \text{ kV/cm}$, (-) $E = 30 \text{ kV/cm}$.

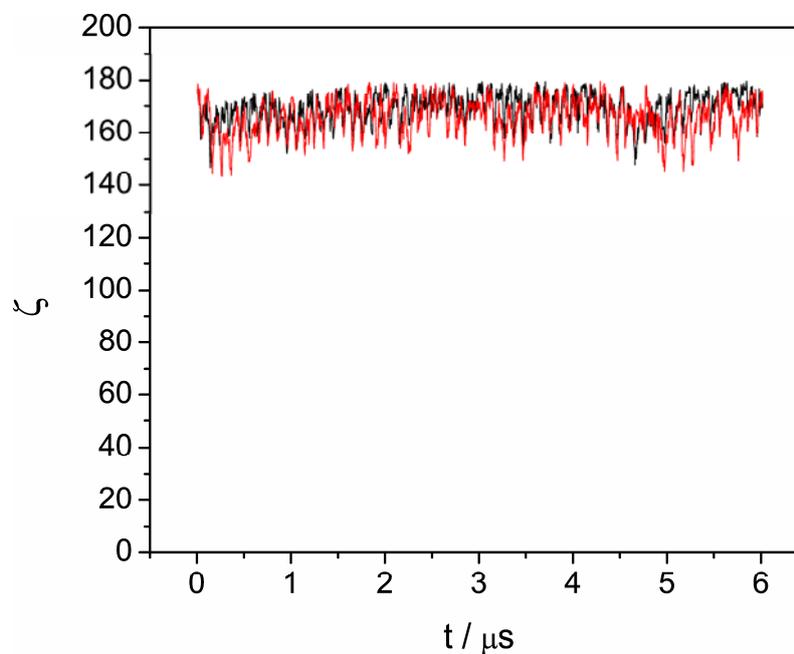


Fig. 7.2. Ángulo ζ en función del tiempo para diferentes intensidades de campo eléctrico aplicado. (-) $E = 0 \text{ kV/cm}$, (-) $E = 30 \text{ kV/cm}$.

7.4.3 Distribución radial de iones

La distribución de iones Na^+ alrededor de las esferas del ADN se caracterizó mediante la función de distribución radial (FDR). En general, la función de distribución radial o función de correlación de a pares $g_{AB}(r)$ entre partículas de tipo A y B se define de la siguiente manera⁴⁵

$$g_{AB}(r) = \frac{\langle \rho_B(r) \rangle}{\langle \rho_B \rangle_{local}} = \frac{1}{\langle \rho_B \rangle_{local}} \frac{1}{N_A} \sum_{i \in A} \sum_{j \in B} \frac{\delta(r_{ij} - r)}{4\pi r^2} \quad (7.8)$$

donde $\langle \rho_B(r) \rangle$ es la densidad de partículas de tipo B a una distancia r alrededor de las partículas de tipo A y $\langle \rho_B \rangle_{local}$ es la densidad de partículas de tipo B promediada sobre todas esferas alrededor de las partículas de tipo A con una radio $r_{m\acute{a}x}$.

En la práctica, la Ec.(7.8) se resuelve dividiendo al sistema en capas esféricas entre r y $r + dr$ y realizando un histograma en lugar de emplear la función delta. Usualmente $r_{m\acute{a}x}$ es la mitad de la longitud de la caja.

La Fig. 7.3 muestra la FDR de iones Na^+ alrededor de las esferas del ADN. La FDR obtenida presenta un máximo a una distancia aproximadamente igual al radio de las esferas del ADN, distancia a partir de la cual exhibe una serie de picos sucesivos equidistantes una distancia aproximadamente igual al diámetro de estas esferas.

La FDR de iones Na^+ alrededor del ADN en presencia de un campo eléctrico de intensidad $E = 30 \text{ kV/cm}$ es igual a la FDR en ausencia de campo eléctrico (Fig. 7.3). Es decir, que un campo eléctrico con esta intensidad no produce desprendimiento de iones de la cadena de ADN. Se corroboró que este mismo comportamiento tiene lugar también para campos eléctricos con intensidades menores.

El efecto del campo eléctrico es producir una redistribución de los iones Na^+ a lo largo de la cadena de ADN, en relación a la distribución en ausencia de campo eléctrico aplicado. Esto se puede observar en las Figs. 7.4 y 7.5, en donde se muestra la FDR de iones Na^+ alrededor las esferas de uno y otro extremo de la cadena de ADN. Mientras en un extremo (esfera 21) se produce un defecto de iones debido al campo eléctrico, en el otro extremo (esfera 1) se produce un exceso. Este efecto se intensifica con la intensidad del campo eléctrico (Figs. 7.4 y 7.5).

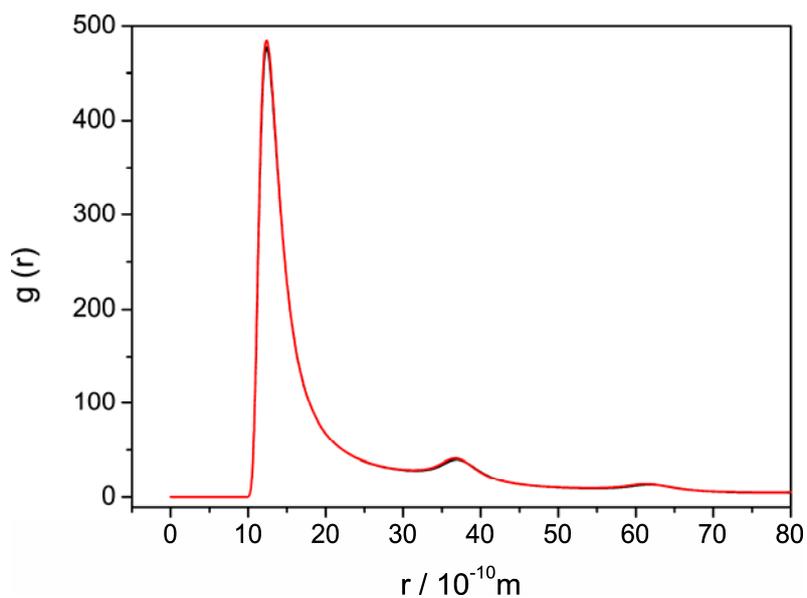


Fig. 7.3. FDR de iones Na^+ alrededor de las esferas de la cadena de ADN para diferentes intensidades de campo eléctrico aplicado. (-) $E = 0 \text{ kV/cm}$, (-) $E = 30 \text{ kV/cm}$.

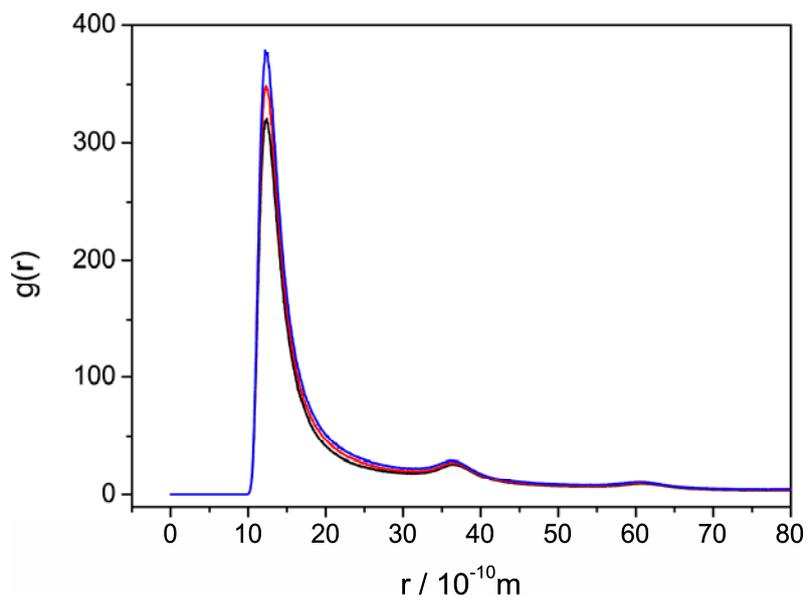


Fig. 7.4. FDR de iones Na^+ alrededor de la esfera 1 de la cadena de ADN para diferentes intensidades de campo eléctrico aplicado. (-) $E = 0 \text{ kV/cm}$, (-) $E = 15 \text{ kV/cm}$, (-) $E = 30 \text{ kV/cm}$

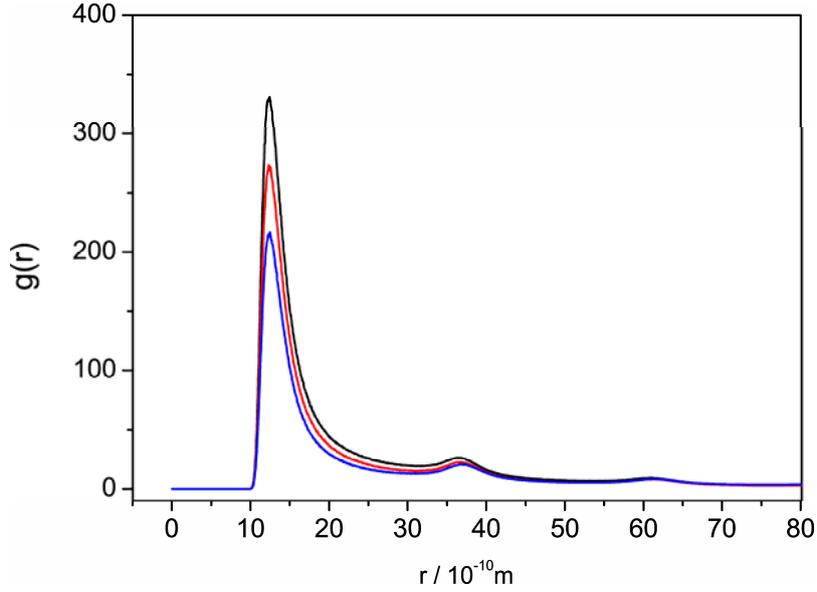


Fig. 7.5. FDR de iones Na^+ alrededor de la esfera 21 de la cadena de ADN para diferentes intensidades de campo eléctrico aplicado. (-) $E = 0 \text{ kV/cm}$, (-) $E = 15 \text{ kV/cm}$, (-) $E = 30 \text{ kV/cm}$

7.4.4 Función de orientación en un campo eléctrico

Para estudiar la orientación de los fragmentos de ADN en un campo eléctrico introducimos una función de orientación que se define a partir de la birrefringencia o el dichroísmo eléctricos de la siguiente manera¹⁹

$$\Phi = \frac{\Delta n}{\Delta n_s} = \frac{(\Delta A / A)}{(\Delta A / A)_s} \quad (7.9)$$

donde Δn_s es la birrefringencia eléctrica de saturación y $(\Delta A / A)_s$ es el dichroísmo eléctrico reducido de saturación. La terminología “de saturación” se refiere a que las cantidades correspondientes deben evaluarse en el límite de campo eléctrico infinito.

Supongamos que cada *bond* o conector de la cadena de soluto es un sistema cilíndricamente simétrico con anisotropía de polarizabilidad óptica $\Delta\alpha^o$. Suponiendo que las propiedades ópticas son aditivas y que la solución es diluida se puede expresar la birrefringencia eléctrica de la siguiente manera¹⁹

$$\Delta n = k \sum_{i=1}^{N-1} \Delta\alpha^o \frac{\langle 3 \cos^2 \theta_i - 1 \rangle}{2} \quad (7.10)$$

donde k es una constante dependiente del sistema de unidades empleado, que carecerá de importancia para nuestro propósito actual. La suma en la Ec.(7.10) se debe realizar sobre todos los conectores en una molécula, los que tienen una orientación θ_i con respecto a la

dirección del campo eléctrico. Los corchetes angulares representan el promedio estadístico sobre las distintas orientaciones.

Después de un cierto tiempo de aplicado el campo eléctrico, una vez alcanzado el estado estacionario, podemos escribir la Ec.(7.10) como el promedio temporal sobre los datos colectados en una trayectoria de simulación de la siguiente manera

$$\Delta n = \Delta n_s \frac{1}{N_s(N-1)} \sum_{k=1}^{N_s} \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(3 \cos^2 \theta_{ik} - 1)}{2} \quad (7.11)$$

donde $\Delta n_s = k\Delta\alpha^o(N-1)$ es la birrefringencia eléctrica de saturación. La suma sobre el índice k en la Ec.(7.11) representa el promedio en tiempo, siendo N_s el número de datos colectados en la trayectoria. La dependencia temporal en la Ec.(7.11) viene dada a través del ángulo $\theta_{ik} = \theta_i(t_k)$.

Comparando la Ec.(7.9) con la Ec.(7.11) podemos reconocer que la función de orientación viene dada por la siguiente expresión

$$\Phi = \frac{1}{N_s(N-1)} \sum_{k=1}^{N_s} \sum_{i=1}^{N-1} \frac{(3 \cos^2 \theta_{ik} - 1)}{2} \quad (7.11)$$

La función de orientación Φ representa una medida de la orientación promedio de las moléculas en la dirección del campo eléctrico. Para una orientación completa de las moléculas en la dirección del campo eléctrico $\Phi \rightarrow 1$, mientras que $\Phi \rightarrow -0.5$ para orientación perpendicular al mismo.

La función de orientación Φ dada por la Ec.(7.11) representa también el cociente entre el diroísmo eléctrico reducido y el diroísmo eléctrico reducido de saturación (Ec.(7.9)).

A efectos de calcular la función de orientación primero se deja evolucionar el sistema durante un cierto intervalo de tiempo después de aplicado el campo eléctrico. Este intervalo de tiempo debe ser suficientemente largo como para que el sistema alcance un estado estacionario. El tiempo requerido para ello depende de la intensidad del campo eléctrico aplicado, pudiendo superar la decena de microsegundos, dependiendo también de la orientación de la molécula en el momento de aplicar el campo eléctrico. La recolección de datos para calcular la función de orientación empieza recién después de alcanzado el estado estacionario. En este trabajo se promediaron datos recolectados durante un intervalo de tiempo igual a $5 \mu s$.

La Fig. 7.6 muestra los resultados obtenidos para la función de orientación para diferentes intensidades de campo eléctrico aplicado. Los resultados muestran que la función de

orientación incrementa con el campo eléctrico y posteriormente tiende a un valor de saturación. El comportamiento se corresponde cualitativamente al de una función de orientación de partículas polarizables con simetría cilíndrica. La región de intensidades de campo eléctrico menores a 10 kV/cm requiere tiempos de simulación muy largos y no ha sido analizada. Por esta razón resulta difícil apreciar el límite Kerr de campo eléctrico bajo, donde la función de orientación es proporcional al cuadrado de la intensidad del campo eléctrico.

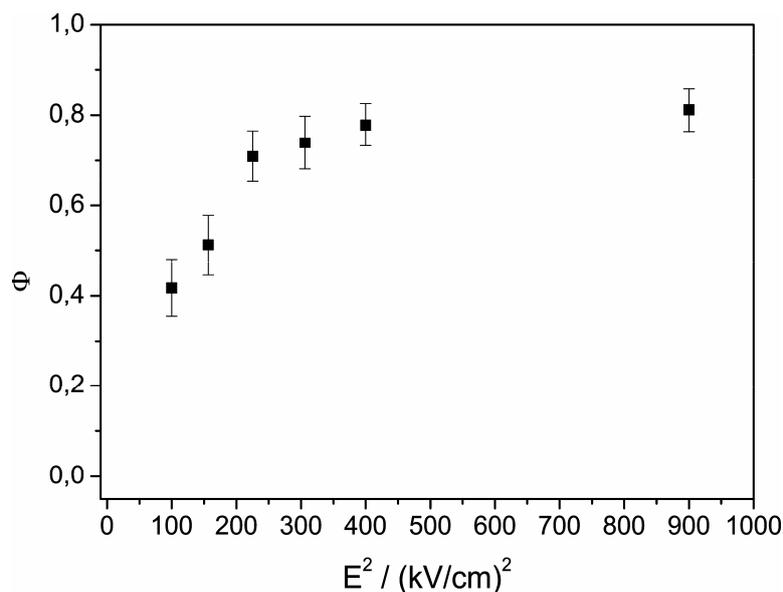


Fig. 7.6. Función de orientación en función del cuadrado de la intensidad del campo eléctrico aplicado.

7.5 Conclusiones del capítulo

El modelo simple implementado en el presente trabajo permite estudiar la orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico mediante simulación dinámica de Langevin con un costo computacional relativamente bajo.

El estudio del proceso orientacional puede realizarse introduciendo una función de orientación que tiene relación directa con la birrefringencia y el dichroísmo eléctricos de soluciones diluidas.

Los resultados obtenidos muestran que el modelo implementado en este capítulo resulta adecuado para describir fragmentos de ADN con longitudes de cadena aproximadamente igual a su longitud de persistencia. Actividades futuras podrían dirigirse hacia la modelización de fragmentos de ADN de mayor peso molecular. Esto podría realizarse sin incrementar la capacidad de cálculo requerida si se mantiene constante el número de esferas y se aumenta la flexibilidad del modelo para representar así moléculas de mayor longitud.

Aspectos aquí omitidos, como las interacciones hidrodinámicas entre las subunidades esféricas, también podrían implementarse.

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis se han abordado diferentes temáticas relativas al estudio de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN en solución salina.

Los desarrollos teóricos y los procedimientos de cálculo numérico implementados en los capítulos 2 y 3 constituyen una herramienta que permite determinar parámetros moleculares mediante el ajuste de datos experimentales de las señales electro-ópticas en función de la intensidad del campo eléctrico aplicado. Los tiempos de cálculo computacional requeridos para estos ajustes son menores que aquellos demandados por las técnicas de simulación computacional. Los resultados teóricos obtenidos corroboran que el acoplamiento hidrodinámico traslación-rotación ocasiona una componente positiva en la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de fragmentos de ADN descritos con el modelo MTA. Esta componente positiva incrementa su magnitud con la asimetría del modelo, llegando a predominar para campos eléctricos de baja intensidad por sobre la componente negativa generada en la polarizabilidad eléctrica. De esta manera, el acoplamiento hidrodinámico explica la inversión de signo de las señales electro-ópticas conforme disminuye la intensidad del campo eléctrico aplicado. A su vez, los resultados obtenidos muestran que el acoplamiento hidrodinámico modula los valores de la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos aún para campos eléctricos de intensidades mucho mayores que aquellas para las que ocurre el efecto anómalo.

La capacidad de ajustar datos experimentales en base a los desarrollos de los capítulos 2 y 3 ha sido evaluada para el caso de soluciones de ADN sonicado con resultados satisfactorios. La polidispersión de las muestras de ADN sonicado puede caracterizarse empleando técnicas de electroforesis en gel. Esto permite determinar la distribución de tamaños de los fragmentos de ADN contenidos en la muestra e implementar la polidispersión en el análisis teórico considerando a la solución como una mezcla de partículas tipo arco de diferentes longitudes. La técnica de sonicado, aunque no permite disponer de soluciones monodispersas, es ventajosa frente a otras técnicas debido a su gran practicidad para disponer de fragmentos de ADN en cantidad suficiente para realizar medidas electro-ópticas. Por lo tanto, es realmente importante disponer de un marco teórico como el aquí implementado que permita determinar correctamente parámetros físicos de las moléculas a partir del ajuste de datos experimentales. A futuro, resultaría interesante implementar técnicas experimentales que permitan disponer

únicamente de los fragmentos de ADN más pequeños contenidos en las muestras sonicadas y disminuir el grado de polidispersión. Este procedimiento permitiría una descripción teórica más precisa de los fragmentos con el modelo de arco y contribuiría a mejorar el ajuste de los datos experimentales.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el capítulo 6 demuestran que los efectos asociados al tamaño finito de las moléculas de ADN con respecto a la longitud de onda de la luz, influyen significativamente para estudiar cómo las propiedades ópticas de las partes de una molécula contribuyen a las propiedades ópticas de las mismas. El análisis en cuestión se realizó en base al modelo MTVQ y es estrictamente válido para este modelo. Actividades futuras podrían dirigirse a demostrar la validez de las conclusiones para modelos con geometrías diferentes al MTVQ.

Las actividades presentadas en el capítulo 7 muestran que la simulación computacional constituye una herramienta capaz de incluir aspectos de difícil implementación en los análisis teóricos. En particular, en este trabajo hemos estudiado con simulación dinámica de Langevin la orientación de fragmentos de ADN en un campo eléctrico. Con este fin, se implementó un modelo molecular muy simple para describir a fragmentos de ADN con longitudes de cadena aproximadamente igual a su longitud de persistencia. La simplicidad del modelo permite incluir explícitamente iones, en nuestro caso Na^+ , en el sistema. La orientación de las moléculas en un campo eléctrico se puede estudiar introduciendo una función de orientación que se relaciona con la birrefringencia y el dicroísmo eléctricos de soluciones diluidas. Los resultados obtenidos para la función de orientación en función del campo eléctrico están en acuerdo cualitativo con las predicciones teóricas para partículas polarizables con simetría cilíndrica. En un futuro, se podrían dirigir las actividades hacia la modelización de fragmentos de ADN de mayor peso molecular y a estudiar los efectos debidos a la flexibilidad molecular sobre el proceso orientacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kerr, J., *A new relation between electricity and light: dielectrified media birefringent*. Philosophical Magazine, 50, 337-348 (1875).
2. O’Konski, C. T., Yoshioka, K., Orttung, W. H., *Electric properties of macromolecules IV. Determination of electric and optical parameters from saturation of electric birefringence in solutions*. Journal of Physical Chemistry, 63: 1558-1565 (1959).
3. Holcomb, D. N., Tinoco, I., *Electrical birefringence at high fields*. Journal of Physical Chemistry, 67: 2691-2698 (1963).
4. Porschke, D., *DNA double helices with positive electric dichroism and permanent dipole moments: non-symmetric charge distribution and “frozen” configurations*. Biophysical Chemistry, 49, 127-139 (1994).
5. Brenner, H., *Coupling between the translational and rotational Brownian motions of rigid particles of arbitrary size II. General theory*. Journal of Colloid and Interface Science, 23, 407-436 (1967).
6. Bertolotto, J. A., *Electric birefringence and dichroism of DNA fragments in aqueous solution*. Physica A, 373, 29-42 (2007).
7. Porschke, D., Antosiewicz, J. M., *Strong effect of hydrodynamic coupling on the electric dichroism of bent rods*. Journal of Physical Chemistry B, 109, 1034-1038 (2005).
8. Taylor, E. W., Cramer, W., *Birefringence of protein solutions and biological systems I*. Biophysical Journal, 3, 127-141 (1963).
9. Van de Hulst, H. C., *Light scattering by small particles*. Wiley, New York (1957).
10. Ridgeway, D., *Transient Electric Birefringence of Suspensions of Asymmetric Ellipsoids*. Journal of American Chemical Society, 88, 1104-1112 (1966).
11. Stoylov, S.P., *Colloid Electro-optics: Theory, Techniques, Applications*. Academic, San Diego (1991).
12. DeVoe, H., *Optical properties of molecular aggregates. II. Classical theory of the*

- refraction, absorption, and optical activity of solutions and crystals*. Journal of Chemical Physics, 43, 3199-3208 (1964).
13. DeVoe, H., *The theory of hypochromism of biopolymers: calculated spectra for DNA*. Annals New York Academy of Sciences, 158, 298-307 (1969).
 14. Self, B.D., Moore, D.S., *Nucleic acid vibrational circular dichroism, absorption, and linear dichroism spectra. I. A DeVoe theory approach*. Biophysical Journal, 73, 339-347 (1997).
 15. Self, B.D., Moore, D.S., *Nucleic acid vibrational circular dichroism, absorption, and linear dichroism spectra. II. A DeVoe theory approach*. Biophysical Journal, 74, 2249-2258 (1998).
 16. Purcell, E.M., Pennypacker, C.R., *Scattering and absorption of light by nonspherical dielectric grains*. Astrophysical Journal, 186, 705-714 (1973).
 17. García de la Torre, J., *Dynamic electro-optic properties of macromolecules and nanoparticles in solution: A review of computational and simulation methodologies*. Journal of Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 56, 4-15 (2007).
 18. Mazur, S., Allison, S. A., *Brownian dynamics simulations of DNA in strong electric fields*. Journal of Physical Chemistry B, 101, 2244-2250 (1997).
 19. Fredericq, E., and Houssier, C., *Electric dichroism and electric birefringence*. Clarendon Press, Oxford (1973).
 20. Jackson, J.D., *Classical Electrodynamics*. Wiley, New York (1975).
 21. Cantor, C. R., Schimmel, P. R., *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. Freeman, New York (1980).
 22. Schellman, J., *Circular dichroism and optical rotation*. Chemical Reviews, 75, 323-331 (1975).
 23. Weers, L. Y., Stellwagen, NC., *DNA persistence length revisited*. Biopolymers, 61, 261-275 (2002).
 24. Bertolotto, J.A., Campo, M.G., Roston, G.B., Ascheri, M.E., *Dependence of DNA steady-state electric birefringence on field strength*. Journal of Colloid Surfaces A, 203, 167-183 (2002).
 25. Wegener, W. A., *Transient electric birefringence of dilute rigid body suspensions at low*

- field strength*. Journal of Chemical Physics, 84, 5989-6004 (1986).
26. Brenner, H., *The Stokes resistance of an arbitrary particle II: An extension*. Chemical Engineering Science, 19, 599-629 (1964).
 27. Bertolotto, J. A., Corral, G. M., Farías de La Torre, E. M., Roston, G. B., *Electric dichroism transients of aqueous solutions of DNA*. Journal of Physics: Condensed Matter, 22, 494101 (2010).
 28. Goldstein, H., *Classical Mechanics*, Addison Wesley, Massachusetts (1980).
 29. Landau, L. D., Lifshitz, E. M., *Mecánica*, Ed. Reverté, Barcelona (1970).
 30. Collatz, L., *The numerical treatment of differential equations*. Springer-Verlag, Berlin (1966).
 31. Risken, H., *The Fokker-Planck equation*. 2^a ed. Springer, Berlin (1989).
 32. García de la Torre, J., G. del Río, Ortega, A., *Improved calculation of rotational diffusion and intrinsic viscosity of bead models for macromolecules and nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry, 111, 955-961 (2007).
 33. Böttcher, J. F., *Theory of electric polarization*. Elsevier, Amsterdam (1973).
 34. Bertolotto, J.A., Perez Reale, M.V., Bergonzi Rodriguez, M.D., *Determinación del tensor polarizabilidad óptica del ADN tipo varilla quebrada*. Anales AFA, 302-306 (1999).
 35. Bertolotto, J. A., P. Willging, Pugnaroni, L., Bustos, H., *Instrumento para la medición de birrefringencia y dicroísmo en macromoléculas y coloides*. Anales AFA, 5, 486-488 (1993).
 36. Kratky D., Porod, G., *Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle*. Rec. Trav. Chain., 68, 1106-1123 (1949).
 37. Fukudome, K., Yamaoka, K., Nishikori, K., Tatehata, H., Yamamoto, O., *Ultrasonic scission of deoxyribonucleic acid in aqueous solution II. Precipitacional fractionation and molecular weights of sonicated samples*. Polymer Journal, 18, 81-88 (1986).
 38. Valcárcel Cases, M., Gómez, Henz, A., *Técnicas analíticas de separación*. Reverté, Barcelona (1994).
 39. Segelstein, D. J., *The complex refractive index of water*. M.S. Thesis, University of Missouri-Kansas City (1981).

40. Yamaoka, K., Matsuda, K., *Electric dichroism study of a sonicated DNA and its complex with an acridine dye in aqueous solutions: field-strength dependence and linear dichroic spectra*. *Macromolecules*, 14, 595-601 (1981).
41. Sontag, W., Weibezahn, K.F., *Absorption of DNA in the region of vacuum-uv (3-25 eV)*. *Radiation and Environmental Biophysics*, 12, 169-174 (1975).
42. Kiseleva, M.N., Zarochentseva, P., Dodonova, N., *Absorption spectra of nucleic acids and related compounds in the spectral region 120-280 nm*. *Biofizika*, 20, 571-575 (1975).
43. Shapiro, D.B., Hull, P.G., Hunt, A.J., Hearst, J.E., *Calculations of the Mueller scattering matrix for a DNA plectonemic helix*. *Journal of Chemical Physics*, 101, 4214-4221 (1994).
44. Allen, M. P., Tildesley, D. J., *Computer simulation of liquids*, Clarendon Press, Oxford (1989).
45. van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Kutzner, C., van Buuren, A. R., Apol, E., Meulenhoff, P. J., Tieleman, D. P., Sijbers, A. L. T. M., Feenstra, K. A., van Drunen, R., Berendsen, H. J. C., *Gromacs User Manual version 4.0*. Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, Internet: <http://www.gromacs.org>.
46. García de la Torre, J., Pérez Sánchez, H. E., Ortega, A., Hernández, J. G., Fernández, M. X., Díaz, F. G., López Martínez, M. C., *Calculation of the solution properties of flexible macromolecules: methods and applications*. *European Biophysics Journal*, 32, 477-486 (2003).
47. Schellman, J., *Flexibility of DNA*. *Biopolymers*, 13, 217-226 (1974).

ANEXO

TRABAJOS PUBLICADOS

Optical Properties of DNA in Aqueous Solution

J. P. Umazano · J. A. Bertolotto

Received: 30 October 2007 / Accepted: 15 February 2008 /
Published online: 23 May 2008
© Springer Science + Business Media B.V. 2008

Abstract In the study of DNA electric birefringence, it is usual to use theories that consider that molecules in solution are small in relation to the light wavelength. In this work, we study the DNA electric birefringence using a broken-rod macroion (BRM) model composed of two cylindrical arms which does not restrict the size of the molecules. To achieve this, we include the inhomogeneity effect of the light electric field through the molecule and the interaction between its different parts. To analyze the interaction between a molecule and the incident beam of light, we apply the discrete dipole approximation (DDA), according to which each molecule is described as a finite array of electronic coupled oscillators. The electric birefringence is calculated from the oscillator polarizability. This is obtained from experimental data of electric birefringence saturation and from the increment of the solution refraction index in relation to that of the solvent. Furthermore, the oscillator polarizability is also estimated from DNA absorption spectrum using the Kronig–Kramers relations. This allows us to analyze the contributions of the different absorption bands of DNA to the electric birefringence. We analyze the influence of the inhomogeneity of the light electric field and of the intramolecular interactions in the characterization of DNA optical properties using electric birefringence measurements.

Keywords DNA · Electric birefringence · Discrete dipole approximation · Optical polarizability · UV absorption spectra · Large molecule

1 Introduction

An aqueous solution of DNA fragments shows itself birefringent when an external electric field is applied to it. This occurs because the external electric field orients the molecules in

J. P. Umazano
Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB)–UNLP, La Plata, Argentina

J. P. Umazano
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina

J. P. Umazano (✉) · J. A. Bertolotto
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales–UNLPam, Santa Rosa (La Pampa), Argentina
e-mail: pumazano@exactas.unlpam.edu.ar

solution. Electric birefringence is defined as the difference between the real refraction indexes for incident plane polarized light with its polarization plane parallel and perpendicular to the external electric field.

Experimental data of electrooptical properties of restriction-enzyme-digested DNA and sonicated DNA has been acceptably adjusted using a broken-rod macroion (BRM) model [1] composed of two cylindrical arms. However, the theories for the study of electric birefringence habitually used [2–4] assumes that the molecules are small compared to the light wavelength. We consider it interesting to remove this assumption to estimate the degree of validity of these theories. To do this, we need to consider two effects: the inhomogeneity of the light electric field in the space occupied by the molecule and the interaction between its different parts.

The problem of flow birefringence of molecules whose length is not small compared to the wavelength was analyzed by Taylor and Cramer [5] using the light scattering theory. However, they considered that the molecules in solution are highly orientated to satisfy the necessary conditions for the validity of the Rayleigh–Gans approximation. In the case of electric birefringence, this consideration is satisfied only for very high electric field strength, i.e., in the saturation state. There are some other works that studied the optical anisotropy of large molecules based on their scattering properties. The anisotropy of the optical polarizability in the Rayleigh–Gans approximation was analyzed by Stoylov and Stoimenova [6]. The same approximation was used by Ridgeway [7] in his study of transient electric birefringence of asymmetric ellipsoids. Orientational birefringence in the approximations of Stevenson and Ikeda were analyzed by Stoimenova and Stoylov [8]. A good discussion about electric birefringence from light scattering theories is given in Stoylov's book [9]. It is important to note that when the light scattering approximations are used to study the electric birefringence, the effect of the interaction between the different parts of the molecules is not included.

An alternative study of electric birefringence including the retardation effects of the light electric field and the interaction between the different parts of the molecule can be made using the discrete dipole approximation (DDA) to describe the optical properties of the molecules in solution. DDA, also known as the coupled dipole approximation (CDA), was developed initially by DeVoe [10] to study the optical properties of molecular small aggregates including the intramolecular interactions. Later, Purcell and Pennypacker [11] removed the restriction of small molecules including the retardation effects of the light electric field in their study of light scattering and absorption by nonspherical dielectric grains. Basically, DDA describes the optical properties of the molecules with a finite array of electronic coupled oscillators having complex polarizabilities that represent the electronic transitions in the molecule. One application of DeVoe's theory to the study of optical properties of DNA molecules was done by Self and Moore [12, 13] who studied the absorption and dichroism of DNA in the infrared region.

In the present work, we use the DDA to study the electric birefringence of DNA fragments like BRM with comparable dimensions to the light wavelength including the inhomogeneity of the light electric field and the intramolecular interactions. Electric birefringence is expressed as function of the oscillators' optical polarizability at visible wavelengths. This is obtained from experimental data of saturation electric birefringence and increment of refraction index of solution with respect to the solvent. We also use the Kronig–Kramers relations to analyze the contribution of the different absorption bands to the electric birefringence. Although the calculation of electric birefringence is done for a BRM model, the developed study can be applied to molecules with more complex geometries.

2 Theory

2.1 Theoretical Background

Let us consider an aqueous solution of DNA fragments orientated due to the presence of an external electric field. In this case, the solution behaves as a uniaxial crystal with its optical axis parallel to the external electric field. Let us suppose that a plane polarized beam of light that propagates perpendicularly to the optical axis falls upon the solution. The laboratory coordinate system (LCS) is chosen with its x - and z -axes coincident with the propagation direction of light and the external electric field direction, respectively. The light will propagate through the solution with its electric field vector given by:

$$\mathbf{E}(x) = \begin{bmatrix} 0 \\ E_{oy} \exp(-in_y \omega x/c) \\ E_{oz} \exp(-in_z \omega x/c) \end{bmatrix} \quad (1)$$

where n_y and n_z are the complex refraction indexes of the solution in the directions y and z , respectively, ω is the angular frequency of the light, and c is the light velocity in vacuum.

The interaction between the light electric field and the molecules leads to the electronic polarization of the system. The polarization vector is important because it allows connecting the macroscopic properties of the solution, such as the refraction indexes, with the microscopic properties of the individual molecules. From a macroscopic view point, the polarization vector is given by:

$$\mathbf{P}(x) = \begin{bmatrix} 0 \\ P_{oy} \exp(-in_y \omega x/c) \\ P_{oz} \exp(-in_z \omega x/c) \end{bmatrix} \quad (2)$$

where P_{oy} and P_{oz} are components not dependent on x . Vectors \mathbf{P} and \mathbf{E} are connected through the relation $\mathbf{P} = \epsilon_o [\chi] \mathbf{E}$, where ϵ_o is the electric permittivity of vacuum and $[\chi]$ is the electric susceptibility of the solution. In the LCS, the electric susceptibility is represented by a diagonal tensor whose nonzero components determine the refraction indexes n_y and n_z through the relation:

$$n_k^2 = 1 + \chi_{kk} \quad k = y, z \quad (3)$$

where we use the well-known relations $n_k^2 = \kappa_{kk}$ and $\kappa_{kk} = 1 + \chi_{kk}$, where κ_{kk} ($k=y, z$) are the diagonal components of the relative electric permittivity of the solution.

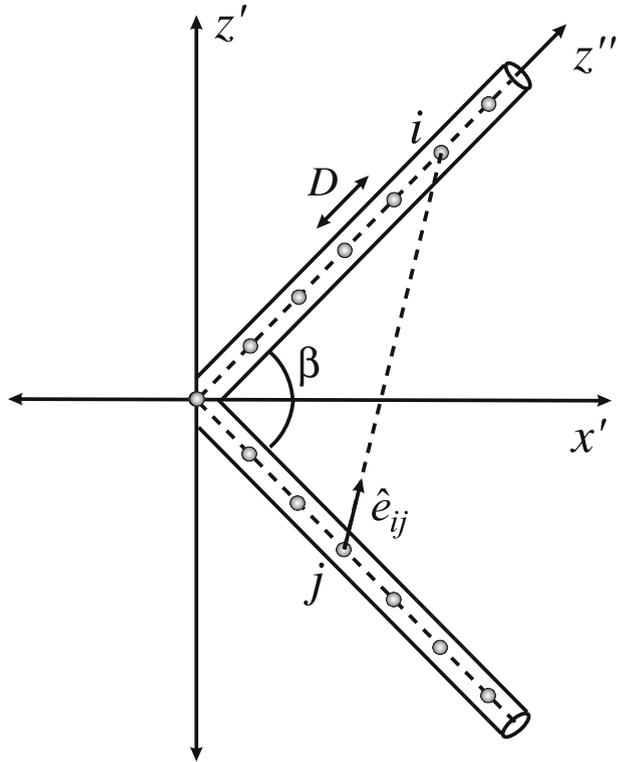
Electric birefringence is defined as the difference between the real refraction indexes in the parallel and perpendicular directions to the optical axis:

$$\Delta n_r = n_{rz} - n_{ry}. \quad (4)$$

2.2 Molecular Model

We use the BRM model to represent the geometry of DNA fragments. The BRM model is composed of two cylindrical arms of length $L/2$ having an angle β between them. The BRM is placed in the plane $x'z'$ of the molecular coordinate system (MCS) as shown in Fig. 1. The BRM model includes as a special case ($\beta=180^\circ$) the straight-rod macroion (SRM) model. Unless the opposite is indicated, in the present work, we will use the BRM model ($\beta \neq 180^\circ$).

Fig. 1 The BRM is placed in a molecular coordinate system $x'y'z'$. The electronic oscillators are placed along each one of its arms. The $x''y''z''$ system is the principal coordinate system for the oscillators belonging to the upper arm



The optical properties of DNA molecules are described using the DDA. In this approximation, each molecule is equivalent to an array of M electronic oscillators that interact among themselves and with the incident light beam. We place the oscillators along each arm of the BRM separated in such a way that the distance D between two any adjacent oscillators is always the same (see Fig. 1). Let us consider an oscillator belonging to the upper arm of the BRM. A system of axes x'', y'', z'' chosen with the z'' -axis coincident with the symmetry axis of the upper arm constitutes the principal coordinate system for this oscillator. In such a system, the optical polarizability of this oscillator is represented by a diagonal tensor:

$$[\alpha] = \begin{bmatrix} \alpha_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{//} \end{bmatrix} \tag{5}$$

where $\alpha_{//}$ and α_{\perp} are the components of the optical polarizability tensor in the parallel and perpendicular directions to the DNA helix, respectively. The optical polarizability tensor of an oscillator that belongs to the upper arm expressed in the MCS is given by:

$$[\alpha_{up}] = \begin{bmatrix} \alpha_{//} \cos^2(\beta/2) + \alpha_{\perp} \sin^2(\beta/2) & 0 & \sin(\beta/2) \cos(\beta/2) (\alpha_{//} - \alpha_{\perp}) \\ 0 & \alpha_{\perp} & 0 \\ \sin(\beta/2) \cos(\beta/2) (\alpha_{//} - \alpha_{\perp}) & 0 & \alpha_{//} \sin^2(\beta/2) + \alpha_{\perp} \cos^2(\beta/2) \end{bmatrix}. \tag{6}$$

In a similar way, we obtain the optical polarizability tensor of an oscillator that belongs to the lower arm in the MCS:

$$[\alpha_{\text{low}}] = \begin{bmatrix} \alpha_{//} \cos^2(\beta/2) + \alpha_{\perp} \sin^2(\beta/2) & 0 & -\sin(\beta/2) \cos(\beta/2) (\alpha_{//} - \alpha_{\perp}) \\ 0 & \alpha_{\perp} & 0 \\ -\sin(\beta/2) \cos(\beta/2) (\alpha_{//} - \alpha_{\perp}) & 0 & \alpha_{//} \sin^2(\beta/2) + \alpha_{\perp} \cos^2(\beta/2) \end{bmatrix}. \tag{7}$$

2.3 Microscopic Analysis of Polarization

In this section, we present a microscopic analysis of the polarization process induced in the solution by the electric field of the incident light. We base our analysis on the use of the DDA to describe the optical properties of the DNA molecules by means of an array of oscillators as indicated in the previous section. The electric field on the i oscillator of a molecule is obtained by adding to the electric field of the incident light the electric field of other oscillators in the molecule and the electric field of the distant molecules treated as continuous by means of the Lorentz–Lorenz approximation. Thus, the electric dipole moment induced in the i oscillator is:

$$\mu_i = \left([R]^{-1} [\alpha_i] [R] \right) \left[\mathbf{E}(x_i) + \frac{1}{3\epsilon_o} \mathbf{P}(x_i) - \sum_j \left([R]^{-1} [T_{ij}] [R] \right) \mu_j \right] \tag{8}$$

where $[R]$ is the Euler angles transformation matrix from the LCS to the MCS and $[T_{ij}]$ is the dipole interaction tensor between the dipoles i and j expressed in the MCS:

$$[T_{ij}] = \frac{1}{4\pi\epsilon_o} \left[k^2 \left([I] - \mathbf{e}_{ij} \mathbf{e}_{ij}^t \right) \frac{1}{r_{ij}} - \left([I] - 3 \mathbf{e}_{ij} \mathbf{e}_{ij}^t \right) \left(\frac{1}{r_{ij}^3} - \frac{ik}{r_{ij}^2} \right) \right] \exp[ikr_{ij}] \tag{9}$$

where \mathbf{e}_{ij} is a unit vector directed from the position of dipole j to the position of dipole i , r_{ij} is the distance between them, and k is the wave vector in the medium. It is necessary to mention that we represented \mathbf{e}_{ij} by a column matrix. Therefore, the product $\mathbf{e}_{ij} \mathbf{e}_{ij}^t$ in the last equation is given by a matrix with dimension 3×3 .

Solving (8) for μ_i , we obtain:

$$\mu_i = \sum_j \left([R]^{-1} [A_{ij}] [R] \right) \left[\mathbf{E}(x_j) + \frac{1}{3\epsilon_o} \mathbf{P}(x_j) \right] \tag{10}$$

where $[A_{ij}]$ (with $i, j = 1, 2, \dots, M$) are blocks of dimension 3×3 of the hypermatrix $[A]$ given by:

$$\begin{bmatrix} [A_{11}] & [A_{12}] & \cdots & [A_{1M}] \\ [A_{21}] & [A_{22}] & \cdots & [A_{2M}] \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ [A_{M1}] & [A_{M2}] & \cdots & [A_{MM}] \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} [B_{11}] & [B_{12}] & \cdots & [B_{1M}] \\ [B_{21}] & [B_{22}] & \cdots & [B_{2M}] \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ [B_{M1}] & [B_{M2}] & \cdots & [B_{MM}] \end{bmatrix}^{-1} \tag{11}$$

where

$$[B_{ij}] = \delta_{ij} [\alpha_i]^{-1} + [T_{ij}]. \tag{12}$$

The dipole moments given by (10) are directly related to the microscopic expression of the polarization vector. In other words, they are related to the electric dipole moment per unit volume average over a macroscopically small volume V_m which nevertheless contains a large number of molecules. The microscopic expression of \mathbf{P} must be compatible with (2) in the sense that it must lead to amplitudes independent of x multiplied by the corresponding factors of phase. We use the same microscopic expression of \mathbf{P} used by DeVoe [10] extended to anisotropic systems:

$$\mathbf{P}(x) = \frac{N_m}{V_m} \sum_i \left\langle \begin{bmatrix} 0 \\ \mu_{iy} \exp[-in_y \omega (x - x_i)/c] \\ \mu_{iz} \exp[-in_z \omega (x - x_i)/c] \end{bmatrix} \right\rangle \tag{13}$$

where N_m is the number of molecules in the volume V_m , μ_{iy} and μ_{iz} are the components of the electric dipole moment μ_i induced on the oscillator i , x_i the x coordinate of this oscillator, and where the sum is extended over all oscillators in a molecule. The angular brackets indicate an average over all orientations.

In the case of solutions, it is necessary to consider the solute and solvent’s contributions to the polarization of the system. Using (10) and (13), we obtain the polarization vector:

$$\mathbf{P}(x) = [N_s \langle \alpha_s \rangle [I] + N \langle [\alpha_m] \rangle] \left[\mathbf{E}(x) + \frac{1}{3\epsilon_o} \mathbf{P}(x) \right] \tag{14}$$

where N_s and N are the number of solvent molecules and solute molecules per unit volume, respectively, $\langle \alpha_s \rangle [I]$ is the average optical polarizability tensor of a solvent molecule (which we suppose isotropic and transparent) and $\langle [\alpha_m] \rangle$ is the average optical polarizability tensor of a solute molecule whose components are defined in the following way:

$$\langle [\alpha_m] \rangle_{kl} = \delta_{kl} \sum_{ij} \left\langle (R^{-1} [A_{ij}] R)_{kl} \exp[-in_k \omega (x_j - x_i)/c] \right\rangle \quad k, l = x, y, z \tag{15}$$

where we approximate the solution refraction index with the solvent refraction index in the argument of the complex exponential. The Kronecker delta δ_{kl} is included because the numeric calculations demonstrate that the nondiagonal elements of $\langle [\alpha_m] \rangle$ are negligible with respect to the diagonals, at least for the analyzed cases in the present work. That is consistent with the diagonality of the electric susceptibility tensor in the LCS.

Solving (14) for polarization and using the relations $\mathbf{P} = \epsilon_o [\chi] \mathbf{E}$ and $n_k^2 = 1 + \chi_{kk}$, we find that the refraction indexes of the solution satisfies:

$$\frac{n_k^2 - 1}{n_k^2 + 2} = \frac{1}{3\epsilon_o} (N_s \langle \alpha_s \rangle + N \langle [\alpha_m] \rangle_{kk}). \tag{16}$$

Separating the refraction indexes of the solution into its real and imaginary parts according to $n = n_{rk} + in_{ik}$ and since, for dilute solutions, $n_{ik} \ll n_{rk}$, the real and imaginary parts of (16) gives:

$$\frac{n_{rk}^2 - 1}{n_{rk}^2 + 2} = \frac{1}{3\epsilon_o} (N_s \langle \alpha_s \rangle + N \operatorname{Re} \langle [\alpha_m] \rangle_{kk}) \tag{17}$$

$$n_{ik} = \frac{N}{2\epsilon_o} A(\lambda) \operatorname{Im} \langle [\alpha_m] \rangle_{kk} \tag{18}$$

where $A(\lambda) = (n_s^2 + 2)^2 / (9n_s)$ is an internal field factor or an environment coefficient dependent on the solvent refraction index n_s .

2.4 Electric Birefringence

Electric birefringence can be expressed as a function of the molecules' microscopic properties applying (17) in the parallel and perpendicular directions to the optical axis:

$$\frac{n_{rz}^2 - 1}{n_{rz}^2 + 2} - \frac{n_{ry}^2 - 1}{n_{ry}^2 + 2} = \frac{N}{3\epsilon_o} \left(\text{Re}\langle [\alpha_m] \rangle_{zz} - \text{Re}\langle [\alpha_m] \rangle_{yy} \right). \tag{19}$$

Making the approximation $(n_{rz}^2 + 2) (n_{ry}^2 + 2) \cong (n_s^2 + 2)^2$ valid for dilute solutions, we obtain the following expression for the electric birefringence:

$$\Delta n_r = \frac{N}{2\epsilon_o} A(\lambda) \left(\text{Re}\langle [\alpha_m] \rangle_{zz} - \text{Re}\langle [\alpha_m] \rangle_{yy} \right). \tag{20}$$

2.5 Light Absorption and Optical Polarizability

There exists a range of wavelengths for which the incident light intensity is attenuated while it passes through the solution. We characterize the solution absorption with the molar extinction coefficient in the absence of an external electric field. Due to the influence of the thermal motions, this case corresponds to a solution of molecules randomly orientated and, therefore, to a solution optically isotropic with a single refraction index which the imaginary part is given by:

$$n_i = \frac{N}{2\epsilon_o} A(\lambda) \text{Im}\langle \alpha_m \rangle \tag{21}$$

where we use the nomenclature $\text{Im}\langle \alpha_m \rangle$ to represent any of the elements $\text{Im}\langle \alpha_m \rangle_{yy}$ or $\text{Im}\langle \alpha_m \rangle_{zz}$ because they are equal for random orientation.

We use the Lambert–Beer law [14] to relate the molar extinction coefficient per mole of molecule $\gamma(\lambda)$ with the imaginary part of the refraction index:

$$\gamma(\lambda) = - \frac{4\pi N_0}{2.3\lambda N} n_i. \tag{22}$$

Replacing (21) in (22), the molar extinction coefficient results:

$$\gamma(\lambda) = - \frac{2\pi N_0}{2.3\lambda \epsilon_o} A(\lambda) \text{Im}\langle \alpha_m \rangle. \tag{23}$$

Equation (23) is useful to determine the imaginary optical polarizability of each oscillator from the experimental data of the absorption spectrum of DNA. At this point, we can determine the real optical polarizability of each oscillator by applying one of the Kronig–Kramers relations [15]:

$$\text{Re } \alpha(\lambda) = - \frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{\text{Im } \alpha(\lambda')}{\lambda' [1 - (\lambda'/\lambda)^2]} d\lambda' \tag{24}$$

where the letter P means the principal values of the integral. The last relation is applied to each of the elements of the optical polarizability tensor.

2.6 Increment of the Solution Refraction Index with Respect to that of the Solvent

Let us consider again the case in which a light beam falls upon a solution of DNA molecules in the absence of the external electric field. Due to the random orientation of the molecules, the solution is characterized by only one refraction index whose real part n_r satisfies:

$$\frac{n_r^2 - 1}{n_r^2 + 2} = \frac{1}{3\varepsilon_o} (N_s \langle \alpha_s \rangle + N \operatorname{Re} \langle \alpha_m \rangle) \quad (25)$$

where $\operatorname{Re} \langle \alpha_m \rangle$ is the average real optical polarizability of a solute molecule calculated for random orientation. For the solvent refraction index, we have a similar equation to (25):

$$\frac{n_s^2 - 1}{n_s^2 + 2} = \frac{N_s}{3\varepsilon_o} \langle \alpha_s \rangle. \quad (26)$$

Subtracting (25) and (26) and making the approximations $(n_r^2 + 2)(n_s^2 + 2) \cong (n_s^2 + 2)^2$ and $n_r + n_s \cong 2n_s$ valid for dilute solutions, we obtain:

$$\delta n_r = \frac{N}{2\varepsilon_o} A(\lambda) \operatorname{Re} \langle \alpha_m \rangle \quad (27)$$

where $\delta n_r = n_r - n_s$ is the increment of the refraction index of the solution with respect to that of the solvent.

For DNA molecules like SRM, without considering the retardation effects of the incident light electric field, the optical polarizability of the oscillators in the visible region can be obtained using experimental measurements of δn_r and of the saturation electric birefringence. In that particular case, the molecule's real optical polarizability in the MCS is represented by a diagonal tensor with elements $\operatorname{Re} \alpha_{m//}$ and $\operatorname{Re} \alpha_{m\perp}$ in the parallel and perpendicular directions to the DNA helix, respectively. The average real optical polarizability of a solute molecule, randomly averaged over all orientations, is given by:

$$\operatorname{Re} \langle \alpha_m \rangle = \frac{1}{3} (2 \operatorname{Re} \alpha_{m\perp} + \operatorname{Re} \alpha_{m//}). \quad (28)$$

Therefore, the increment of the refraction index of the solution with respect to the solvent results:

$$\delta n_r = \frac{N}{6\varepsilon_o} A(\lambda) (2 \operatorname{Re} \alpha_{m\perp} + \operatorname{Re} \alpha_{m//}). \quad (29)$$

3 Results and Discussion

All the calculations in the present work were made in the MATLAB 6.0 environment. The parameters that characterize the used molecular model are: $D=23.8 \text{ \AA}$, $\beta=165^\circ$ for the BRM model, and $\beta=180^\circ$ for the SRM model. The dispersion of the water refraction index has been included using the values reported by Segelstein [16].

3.1 Oscillators' Optical Polarizability from Absorption Spectrum Values

In this section, we determine the real optical polarizability that we must assign to the oscillators to represent the optical properties of DNA in the visible region ($\lambda=589$ nm). The procedure for that consists in integrating the Kronig–Kramers relation given by (24) along all wavelengths where the absorption of DNA is appreciable. We have previously determined the integrand of the Kronig–Kramers relation using the experimental data of the DNA absorption spectrum. In the present work, we use the absorption spectrum shown in Fig. 2. This has been measured by Yamaoka and Matsuda [17] in the region $\lambda>215$ nm for DNA fragments in aqueous solution. For $\lambda<215$ nm, water absorption begins to be significant and, therefore, the data of DNA absorption in aqueous solution for smaller wavelength has not been reported. Nevertheless, we complete the spectrum for $\lambda<215$ nm with measurements made by Sontag and Weibezahn [18] for DNA film. This could be done because both spectra present an identical shape in the region $\lambda>215$ nm. Thus, we could determine a scale factor for the two spectra to coincide in the abovementioned region and we use the same scale factor to complete the spectrum of DNA in aqueous solution with the spectrum of DNA film for $\lambda<215$ nm (see Fig. 2).

The resulting absorption spectrum is divided into five absorption bands indicated by the dashed lines in Figure 2 in which each band is approximated with the Gaussian function:

$$\gamma_i(\lambda) = \gamma_{oi} \exp \left[-\frac{(\lambda - \lambda_i)^2}{2\sigma_i^2} \right] \quad (30)$$

where the peak position λ_i , the maximum molar extinction coefficient γ_{oi} , and the corresponding standard deviation of the i band are given in Table 1.

The optical polarizability tensor of each oscillator is expressed by (5). The subscripts // and \perp are used to represent the anisotropy in the optical properties in the parallel and perpendicular directions to the DNA helix, respectively. To include this anisotropy, we separate the contributions to the optical polarizability of the five absorption Gaussian bands in two different groups depending on its origin. We assigned the absorption bands 1 and 2 to the bases' plane in an isotropic manner to represent the π - π^* transitions predominant at

Fig. 2 DNA absorption spectrum. Reported data for $\lambda>215$ nm by Yamaoka and Matsuda for DNA in aqueous solution. Data for $\lambda<215$ nm are proportional to the ones reported by Sontag and Weibezahn for DNA in film

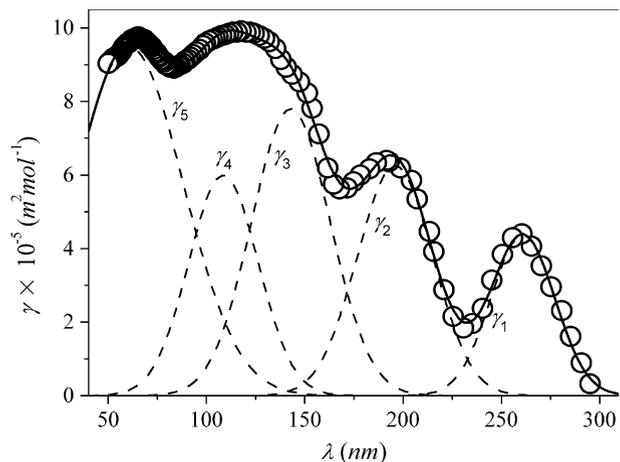


Table 1 Resolution of DNA absorption spectrum into Gaussian components

Band	λ_i (nm)	$\gamma_{oi} \times 10^{-5}$ (m ² mol ⁻¹)	σ_i (nm)
1	260.85	4.38	16.45
2	195.85	6.27	19.18
3	142.95	7.81	20.02
4	108.58	6.01	17.64
5	60.55	9.51	27.60

these wavelengths. Its contribution to the real optical polarizability tensor is expressed in the following way:

$$\text{Re}[\alpha_1]_{589\text{nm}} = \begin{bmatrix} \text{Re } \alpha_1 & 0 & 0 \\ 0 & \text{Re } \alpha_1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}_{589\text{nm}} \tag{31}$$

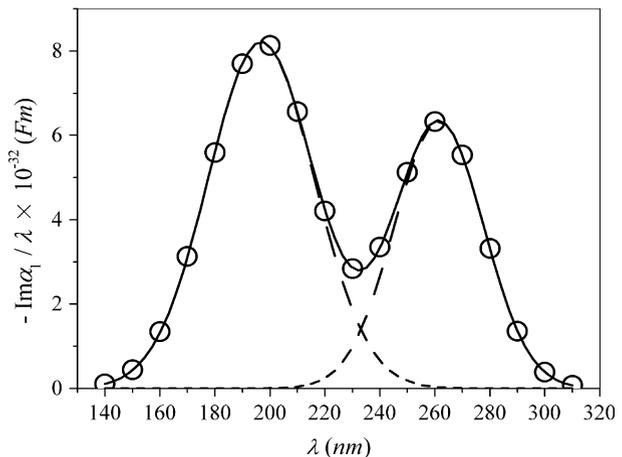
where $\text{Re } \alpha_1(589 \text{ nm})$ is calculated using the Kronig–Kramers relation:

$$\text{Re } \alpha_1(589 \text{ nm}) = -\frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{\text{Im } \alpha_1(\lambda')}{\lambda' [1 - (\lambda'/589 \text{ nm})^2]} d\lambda'. \tag{32}$$

The function $\text{Im } \alpha_1(\lambda')/\lambda'$, necessary to the integration, is adjusted in such a way that (23) reproduces the experimental results of absorption bands $\gamma_1(\lambda)$ and $\gamma_2(\lambda)$ for a discrete set of wavelengths λ_i . Figure 3 shows the obtained values (open circles) for $\text{Im } \alpha_1(\lambda_i)/\lambda_i$ and their corresponding theoretical fits (indicated by the dashed and solid lines).

Kiseleva et al. [19] have reported experimental studies of the absorption of sugar and of phosphate groups for wavelengths shorter than 160 nm. We include this absorption considering the absorption bands $\gamma_3(\lambda)$, $\gamma_4(\lambda)$, and $\gamma_5(\lambda)$ isotropic in the space. The

Fig. 3 Imaginary optical polarizability corresponding to the Gaussian bands 1 and 2



contribution of these three Gaussian bands to the real optical polarizability tensor is expressed in the following way:

$$\text{Re}[\alpha_2]_{589\text{ nm}} = \begin{bmatrix} \text{Re } \alpha_2 & 0 & 0 \\ 0 & \text{Re } \alpha_2 & 0 \\ 0 & 0 & \text{Re } \alpha_2 \end{bmatrix}_{589\text{ nm}} \tag{33}$$

where

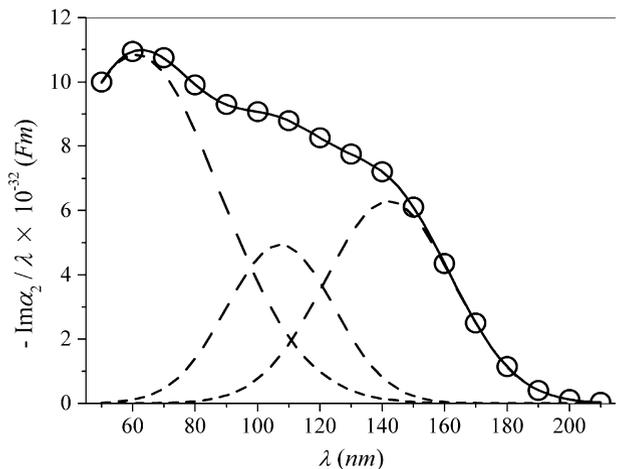
$$\text{Re}[\alpha_2]_{589\text{ nm}} = -\frac{2}{\pi} P \int_0^\infty \frac{\text{Im } \alpha_2(\lambda')}{\lambda' [1 - (\lambda'/589\text{ nm})^2]} d\lambda' \tag{34}$$

In this case, the function $\text{Im } \alpha_2(\lambda')/\lambda'$, necessary for the integration, is adjusted in such a way that (23) reproduces the experimental results of absorption bands $\gamma_3(\lambda)$, $\gamma_4(\lambda)$, and $\gamma_5(\lambda)$ for a discrete set of wavelengths λ_i . Figure 4 shows the obtained values (circles) for $\text{Im } \alpha_2(\lambda_i)/\lambda_i$ and their corresponding theoretical fitting.

The contributions of the absorption bands 1–2 and 3–4–5 to the real optical polarizability calculated through (32) and (34) are: $\text{Re } \alpha_1(589\text{ nm}) = 4.89 \times 10^{-39}\text{ F m}^2$ and $\text{Re } \alpha_2(589\text{ nm}) = 8.22 \times 10^{-39}\text{ F m}^2$. We considered both contributions to determine the real optical polarizabilities in the parallel and perpendicular directions to the DNA helix adding (31) and (33). Thus, we obtain the values $\text{Re } \alpha_{//}(589\text{ nm}) = 8.22 \times 10^{-39}\text{ F m}^2$ and $\text{Re } \alpha_{\perp}(589\text{ nm}) = 1.31 \times 10^{-38}\text{ F m}^2$.

We explain in this work some aspects related to the functions $\text{Im } \alpha_1(\lambda')/\lambda'$ and $\text{Im } \alpha_2(\lambda')/\lambda'$. To determine these functions using (23), we need to know, at least approximately, the values of $\text{Re } \alpha_1(\lambda_i)$ and $\text{Re } \alpha_2(\lambda_i)$ in the absorption region. The reason for this is that, for molecules composed of more than one oscillator, there exists a small coupling between the real and imaginary parts of the oscillators' optical polarizability. To approximately estimate the values of $\text{Re } \alpha_1(\lambda_i)$ and $\text{Re } \alpha_2(\lambda_i)$, we first suppose that

Fig. 4 Imaginary optical polarizability corresponding to the Gaussian bands 3, 4, and 5



each molecule is composed of only one oscillator. In this case, the real and imaginary parts of the oscillator's optical polarizability are not coupled. Then, the oscillator's imaginary optical polarizability is determined using (23) and, subsequently, the oscillator's real optical polarizability is estimated using the Kronig–Kramers relation. Finally, we estimate $\text{Re } \alpha_1(\lambda_i)$ and $\text{Re } \alpha_2(\lambda_i)$ for molecules composed of M oscillators, dividing by M the obtained values for molecules composed of one oscillator.

3.1.1 Interaction and Retardation Effects Influence

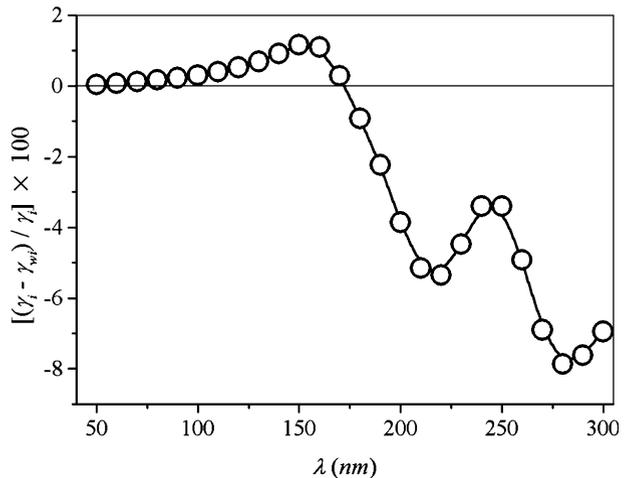
Figure 5 shows the relative percent difference between the theoretical values of the DNA absorption spectrum calculated including and omitting the interaction between oscillators and the retardation effects. We can observe that the combined influence of both effects leads to the increase and the decrease of the absorption for $\lambda < 175$ nm and $\lambda > 175$ nm, approximately. The difference between both absorption spectra increases with the light wavelength and reaches values of up to approximately 8%. These results are important because they justify the inclusion of the interactions and retardation effects in the theoretical model.

3.2 Oscillators Optical Polarizability from Δn_{rs} and δn_r

We obtain a second estimation of the oscillators' optical polarizability in the visible region using the experimental data of saturation electric birefringence Δn_{rs} and of the increment of the solution refraction index with respect to the solvent δn_r . To do that, we consider a SRM model ($\beta=180^\circ$) and we omit the retardation effects of the incident light through the molecule. This approximation is necessary to remove the coupling between the different components of the optical polarizability tensor. Otherwise, we would not be able to determine its components independently one from another.

The saturation electric birefringence corresponds to a complete orientation of the molecules in the direction of the applied electric field. It is obtained from the electric birefringence experimental data as a function of the orienting electric field and extrapolating

Fig. 5 Relative percent difference between the calculated molar extinction coefficients $\gamma_l(\lambda)$ and $\gamma_{wl}(\lambda)$, including and omitting the interactions and the retardation effects, respectively



for infinite electric field strength. From (20), the saturation electric birefringence is given by:

$$\Delta n_{rs} = \frac{N}{2\varepsilon_0} A(\lambda) (\text{Re } \alpha_{m//} - \text{Re } \alpha_{m\perp}). \quad (35)$$

Solving the system of equations formed by (29) and (35) for the elements of the molecular optical polarizability tensor in the MCS, we obtain:

$$\text{Re } \alpha_{m//} = \frac{2\varepsilon_0}{3NA(\lambda)} (3\delta n_r + 2\Delta n_{rs}) \quad (36a)$$

and

$$\text{Re } \alpha_{m\perp} = \frac{2\varepsilon_0}{3NA(\lambda)} (3\delta n_r - \Delta n_{rs}). \quad (36b)$$

The experimental values of Δn_{rs} and δn_r for a solution of DNA fragments with an average length of 1,350 Å, concentration $c=7$ mg/dl, and visible light $\lambda=589$ nm, have been reported by Bertolotto et al. [20]. We use those experimental data and (36a) and (36b) to calculate the following values of the molecular optical polarizability: $\text{Re } \alpha_{m//} = 9.11 \times 10^{-37}$ F m² and $\text{Re } \alpha_{m\perp} = 1.34 \times 10^{-36}$ F m². Then, we adjusted the oscillator optical polarizability in the parallel and perpendicular directions to the DNA helix in such a way that the values of the above obtained molecular optical polarizability are reproduced. That can be made through the following procedure. First, we transform (15) in order to determine $[\alpha_m]$ in the MCS. As we consider in this section a SRM model, the resulting expression of $[\alpha_m]$ is a diagonal matrix with principal elements $\text{Re } \alpha_{m//}$ and $\text{Re } \alpha_{m\perp}$. The dependences of $\text{Re } \alpha_{m//}$ and $\text{Re } \alpha_{m\perp}$ on the oscillator optical polarizability are given by equations (11) and (12). Because we omit the retardation effects, (12) becomes simplified. Second, the theoretical values of $\text{Re } \alpha_{m//}$ and $\text{Re } \alpha_{m\perp}$ are calculated using the oscillator optical polarizabilities, $\text{Re } \alpha_{//}$ and $\text{Re } \alpha_{\perp}$, as variable parameters. Finally, the obtained values of $\text{Re } \alpha_{m//}$ and $\text{Re } \alpha_{m\perp}$ are plotted versus $\text{Re } \alpha_{//}$ and $\text{Re } \alpha_{\perp}$, respectively, and linear fitting to obtain the values of $\text{Re } \alpha_{//}$ and $\text{Re } \alpha_{\perp}$ that reproduce the molecular optical polarizabilities $\text{Re } \alpha_{m//}$ and $\text{Re } \alpha_{m\perp}$ above obtained from the experimental data of Δn_{rs} and δn_r . Based on the procedure described above, our results are the following: $\text{Re } \alpha_{//} = 1.52 \times 10^{-38}$ F m² and $\text{Re } \alpha_{\perp} = 2.45 \times 10^{-38}$ F m².

Comparing the real optical polarizability in the visible region obtained in this section with the values obtained in the previous section, we can see that the results in this section are smaller than those obtained above by a factor of approximately 1.85. This difference can be a consequence of integrating the Kronig–Kramers relation in a finite interval of wavelengths, omitting all absorption out of the ultraviolet region. Infrared absorption of DNA was not included because its relative intensity is low. Shapiro et al. [21], in their study of light scattering by DNA applying DDA, assigned one polarizability per oscillator in the X-ray region. Nevertheless, this polarizability was not included in the present work because it comes from the absorption data for benzene.

3.3 Interaction Influence

We study the interaction influence on the anisotropy of real molecular optical polarizability $\text{Re } \Delta\alpha_m = \text{Re } \alpha_{m//} - \text{Re } \alpha_{m\perp}$. This is equivalent to analyzing the interaction influence on the saturation electric birefringence (see (35)). The retardation effects are not significant in

this case because in the saturation state the molecules are oriented perpendicularly to the incident light. Figure 6 shows the relative percent difference between the theoretical values of $\text{Re } \Delta\alpha_m$ including and omitting the interactions between oscillators for SRM with different lengths. We can observe an increment of the interaction influence with the molecules' length until it reaches a saturation value of approximately 22%. This means that each oscillator of a molecule significantly interacts only with its nearest neighbors and, therefore, for molecules sufficiently large the edge effects are removed.

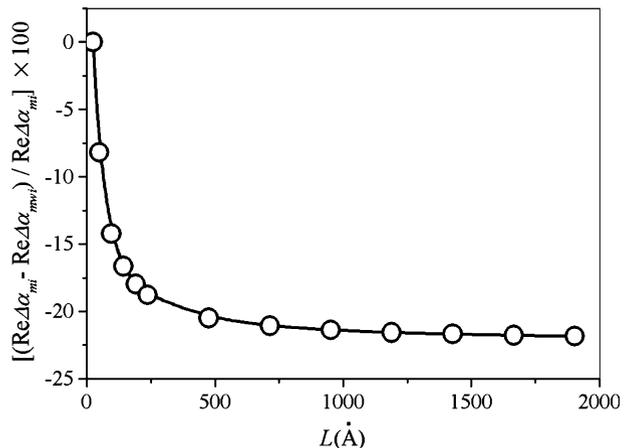
3.4 Comparison with Previous Theories

Equation (20) for the electric birefringence has been deduced for molecules like BRM of arbitrary size. This is the usual expression for the electric birefringence, except for the factor $A(\lambda)$ that is usually approximated with $1/n_s$. However, in our case, unlike previous theories [2–4], it has been deduced without supposing that the molecules are small with respect to the light wavelength. The tensor $\langle [\alpha_m] \rangle$ represents the average response of the whole molecule to the incident light considering the inhomogeneity of the light electric field through the molecule and the interactions between its different parts (see (15)). The restriction to molecules like BRM occurs because the diagonality of tensor $\langle [\alpha_m] \rangle$ is a necessary condition to obtain (20), and this has been proved only for the BRM model. However, the tensor $\langle [\alpha_m] \rangle$ should be diagonal because the electric relative permittivity tensor should be also diagonal in the LCS to optically characterize the solution as a uniaxial crystal. Therefore, we expect that the tensor $\langle [\alpha_m] \rangle$ should be diagonal for molecules with more complex geometries, and we are working to prove this point analytically and numerically.

4 Conclusions

DDA is a valid technique to study the electric birefringence of DNA fragments like BRM with comparable dimensions to the light wavelength. Applying DDA, we can include the inhomogeneity of the light electric field through the molecule and the interactions between its different parts. The usually used theories for electric birefringence, and developed supposing that the molecules are small with respect to light wavelength, remains valid to determine the

Fig. 6 Relative percent difference between the anisotropies of the calculated molecular real optical polarizability $\text{Re } \Delta\alpha_{mi}$ and $\text{Re } \Delta\alpha_{mwi}$, including and omitting the interactions between oscillators, respectively



real molecular optical polarizability even for molecules like BRM with arbitrary size. However, to study the contributions of the different parts of the molecule to the molecular optical polarizability, we must include the retardation effects of the light electric field and the intramolecular interactions. For DNA fragments with comparable dimensions to the light wavelength, the molecular optical properties are affected by the retardation effects and the intramolecular interactions up to approximately 22%.

References

1. Bertolotto, J.A., Campo, M.G., Roston, G.B., Ascheri, M.E.: Dependence of DNA steady-state electric birefringence on field strength. *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.* **203**, 167–183 (2002)
2. Peterlin, A., Stuart, H.A.: Doppelbrechung, insbesondere künstliche Doppelbrechung. In: Euken, A., Wolf, K.L. (eds.) *Hand un Jahrbuch der Chemischen Physik*, vol 8, pp. 1–115. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1943)
3. O’Konski, C.T., Yoshioka, K., Orttung, W.H.: Electric properties of macromolecules. IV. Determination of electric and optical parameters from saturation of electric birefringence in solutions. *J. Phys. Chem.* **63**, 1558–1565 (1959)
4. Holcomb, D.N., Tinoco, I.: Electrical birefringence at high fields. *J. Phys. Chem* **67**, 2691–2698 (1963)
5. Taylor, E.W., Cramer, W.: Birefringence of protein solutions and biological systems. I. *Biophys. J.* **3**, 127–141 (1963)
6. Stoylov, S.P., Stoimenova, M.: Anisotropy of the optical polarizability in the Rayleigh–Debye–Gans approximation. *J. Colloid Interface Sci.* **59**, 179–180 (1977)
7. Ridgeway, D.: Transient electric birefringence of suspensions of asymmetric ellipsoids. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1104–1112 (1966)
8. Stoimenova, M., Stoylov, S.P.: Orientational optic effects from above Rayleigh particles. *J. Colloid Interface Sci.* **76**, 502–514 (1980)
9. Stoylov, S.P.: *Colloid Electro-optics: Theory, Techniques, Applications*. Academic, San Diego (1991)
10. DeVoe, H.: Optical properties of molecular aggregates. II. Classical theory of the refraction, absorption, and optical activity of solutions and crystals. *J. Chem. Phys.* **43**, 3199–3208 (1964)
11. Purcell, E.M., Pennypacker, C.R.: Scattering and absorption of light by nonspherical dielectric grains. *Astrophys. J.* **186**, 705–714 (1973)
12. Self, B.D., Moore, D.S.: Nucleic acid vibrational circular dichroism, absorption, and linear dichroism spectra. I. A DeVoe theory approach. *Biophys. J.* **73**, 339–347 (1997)
13. Self, B.D., Moore, D.S.: Nucleic acid vibrational circular dichroism, absorption, and linear dichroism spectra. II. A DeVoe theory approach. *Biophys. J.* **74**, 2249–2258 (1998)
14. Fredericq, E., Houssier, C.: *Electric Dichroism and Electric Birefringence*. Clarendon, Oxford (1973)
15. Jackson, J.D.: *Classical Electrodynamics*. Wiley, New York (1975)
16. Segelstein, D.J.: The complex refractive index of water. M.S. Thesis, University of Missouri–Kansas City (1981)
17. Yamaoka, K., Matsuda, K.: Electric dichroism study of a sonicated DNA and its complex with an acridine dye in aqueous solutions: field-strength dependence and linear dichroic spectra. *Macromolecules* **14**, 595–601 (1981)
18. Sontag, W., Weibezahn, K.F.: Absorption of DNA in the region of vacuum-uv (3–25 eV). *Radiat. Environ. Biophys.* **12**, 169–174 (1975)
19. Kiseleva, M.N., Zarochentseva, P., Dodonova, N.: Absorption spectra of nucleic acids and related compounds in the spectral region 120–280 nm. *Biofizika* **20**, 571–575 (1975)
20. Bertolotto, J.A., Perez Reale, M.V., Bergonzi Rodriguez, M.D.: Determinación del tensor polarizabilidad óptica del ADN tipo varilla quebrada. In: Gratton, R. (ed) *Anales de la Asociación Física Argentina*, vol. 11, pp. 302–306. Asociación Física Argentina, Buenos Aires (1999)
21. Shapiro, D.B., Hull, P.G., Hunt, A.J., Hearst, J.E.: Calculations of the Mueller scattering matrix for a DNA plectonemic helix. *J. Chem. Phys.* **101**, 4214–4221 (1994)

JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS. ACEPTADO.

INFLUENCE OF HYDRODYNAMIC COUPLING ON THE ELECTRIC LINEAR DICHROISM OF DNA FRAGMENTS

Juan P. Umazano^{1,2,3} and Jorge A. Bertolotto¹

¹*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina,
pumazano@exactas.unlpam.edu.ar*

²*Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina*

³*Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina*

In the present work we study the effect of translational-rotational hydrodynamic coupling on the stationary electric linear dichroism of DNA fragments. The theoretical resolution of the problem has, so far, been dealt with analytic methods only valid in the limit of low electric fields. In this work, we apply numerical methods that allow us to study the problem also considering electric fields of arbitrary strength. We use the bent rod molecules (BRM) model to describe DNA fragments with physical properties characterized by their electric charge, electric polarizability tensor, rotational diffusion tensor and translation-rotation coupling diffusion tensor. The necessary orientational distribution function to calculate electric dichroism is obtained by solving the Fokker-Planck equation through the finite difference method. We analyze the different contributions due to electric polarizability and translational-rotational coupling to the electric dichroism.

I. INTRODUCTION

Physical properties of macromolecules in solution can be studied through electro-optical techniques. In these procedures, an external electric field is applied on the solution to orient the molecules and induce on it an optical anisotropy. In this way, electric dichroism is induced on the solution, which also manifests itself birefringent. For macromolecules that can be described by simple geometrical shapes, such as cylinders and ellipsoids, the study of the orientation process is relatively simple. In these cases, the molecules orientate themselves due to the interaction between their electric properties (permanent and/or induced electric dipolar moment) with the applied electric field. Once the stationary state is achieved, the orientations can be described with Boltzmann distribution function. However, for asymmetrical shaped particles the analysis is more complex due the hydrodynamic coupling between their translational and rotational movements. Such coupling for rigid arbitrary shaped particles immersed in a fluid at low Reynolds number has been described by Brenner¹ some years ago. Nevertheless, the inclusion of hydrodynamic coupling in electro-optical theories is relatively recent. As the torque generated by hydrodynamic coupling is dissipative, the orientational distributional function is not Boltzmannian and must be calculated through the Fokker-Planck equation.

Some advances towards the study of electro-optical effects (electric birefringence and dichroism) of arbitrarily shaped rigid particles have been made. In this sense, Wegener et al.² developed a general formalism for electro-optical effects decay without consider the translation-rotation coupling of molecules. Later, Wegener^{3,4} studied the transient electric birefringence, rise and decay of this, including the torque due to the hydrodynamic coupling derived explicit birefringence expressions for the Kerr limit of static and time dependent weak electric fields. Recently, Kalmykov⁵ developed an alternative approach to the one made by Wegener using a matrix method. Although this method could be, in principle, generalized to incorporate the translation-rotation coupling, this generalization has not been included in his work.

Stationary electric birefringence and dichroism for bent rod DNA fragments have been theoretically studied by Bertolotto and co-workers⁶⁻¹⁰ in the limit of low electric field strengths. They have found that translational-rotational hydrodynamic coupling produces a positive contribution in the electro-optical effects. The requirement for low electric field strengths is originated in the use of approximate analytic methods to solve the Fokker-Planck

equation. The effect of the hydrodynamic coupling on electro-optical transients of bent rods DNA fragments was studied through Brownian dynamic simulation by Porschke and co-workers¹¹⁻¹³. The existence of a positive contribution on the electro-optical effects due to hydrodynamic coupling is confirmed by its computational simulations. The inclusion of hydrodynamic coupling is decisive to explain why the electric birefringence and dichroism of DNA fragments of relatively long length change its habitual negative sign at low electric field.

In this work, we study the coupling influence between translational and rotational diffusion on the stationary electric dichroism of bent rod DNA fragments orientated by external electric field with arbitrary strength. The bent rods are considered charged and polarizable particles. The orientational distribution function needed to calculate electric dichroism is obtained numerically solving the Fokker-Planck equation through the finite difference method. The individual contributions to the reduced electric dichroism of different orientation mechanisms are calculated. Besides, to estimate the error of the numerical calculations, particular cases are analyzed, for which the orientational distribution function is exactly known.

II. THEORY

A. Molecular model

DNA fragments are modelled as rigid bent rod molecules (BRM) geometrically characterized by their arc length S_0 , curvature radius R and bending angle $2\gamma_0$. The BRM is put on the plane $X'Z'$ of the body coordinate system $O'X'Y'Z'$ which origin O' coincides with the BRM centre of mass. The molecule electric properties are its electric charge q and its electric polarizability tensor $[\alpha^E]$ which principal elements are

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

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

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

where K is an electric polarizability constant and a the length through which the bounded counterions can be displaced in radial direction in any point of the BRM. This model for electric polarizability of BRM was developed by Bertolotto et al.¹⁰. The hydrodynamic

properties of BRM are given by its rotational diffusion tensor $[R]$ with principal elements $R_{x'x'}$, $R_{y'y'}$ and $R_{z'z'}$, and the translation- rotation coupling diffusion tensor $[P]$ with nonzero elements $P_{y'z'}$ and $P_{z'y'}$. The optical properties are represented by the transition moment of each BRM chromophore group.

B. Orientational distribution function

The position and orientation of BRM with respect to the laboratory coordinate system $OXYZ$ are given by the coordinates x, y, z of the O' origin of the body coordinate system and the three Euler angles ϕ , θ and ψ . We need to obtain the orientational distribution function of particles $f(\mathbf{\Omega}, t)$ when the electric field is applied on the solution, where $\mathbf{\Omega} = \langle x, y, z, \phi, \theta, \psi \rangle$. The Z axis direction is arbitrarily chosen matching the direction of the applied electric field. The distribution function $f(\mathbf{\Omega}, t)$ is determined by the Fokker-Planck equation of the system

$$\frac{\partial f(\mathbf{\Omega}, t)}{\partial t} = -\frac{1}{\sqrt{g}} \vec{\nabla}_{\mathbf{\Omega}} \cdot [\sqrt{g} \mathbf{J}(\mathbf{\Omega}, t)]. \quad (4)$$

where $\vec{\nabla}_{\mathbf{\Omega}} = \langle \partial/\partial x, \partial/\partial y, \partial/\partial z, \partial/\partial \phi, \partial/\partial \theta, \partial/\partial \psi \rangle$, $g = \sin^2 \theta$ is the determinant of the metric tensor, and $\mathbf{J}(\mathbf{\Omega}, t)$ is the probability current which depends on the derive and diffusion moments \mathbf{M}_1 and $[M_2]$, respectively, in the following way

$$\mathbf{J}(\mathbf{\Omega}, t) = \mathbf{M}_1 f(\mathbf{\Omega}, t) - \frac{1}{2} \vec{\nabla}_{\mathbf{\Omega}} ([M_2] f(\mathbf{\Omega}, t)). \quad (5)$$

In the following lines, we will make some assumptions to simplify the number of variables in our problem. We suppose that, in the time in which the rotational equilibrium is reached, the electroforetic migration does not modify the molecules spatial concentration. Thus, the orientational distribution function is independent from the position coordinates. Besides, as the electric field introduces a cylindrical symmetry in the system, f also results independent from ϕ angle. Under these simplifications Eq. (4) can be developed introducing a local coordinate system and then transforming it into a laboratory coordinate system. Details about this calculation were described by Bertolotto⁹ and will be omitted in this work. Through the above mentioned procedure the Fokker-Planck equation in the stationary state results

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

where

$$Q_{\theta\theta} = (R_{x'x'} \cos^2 \psi + R_{y'y'} \sin^2 \psi),$$

$$Q_{\psi\psi} = (R_{x'x'} \sin^2 \psi \cot^2 \theta + R_{y'y'} \cos^2 \psi \cot^2 \theta + R_{z'z'}),$$

$$Q_{\psi\theta} = 2(R_{y'y'} - R_{x'x'}) \sin \psi \cos \psi \cot \theta,$$

$$Q_{\theta} = \cot \theta (R_{x'x'} \sin^2 \psi + R_{y'y'} \cos^2 \psi) - \frac{E^2}{k_B T} \cos \theta \sin \theta [(\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) R_{x'x'} \cos^2 \psi - (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) R_{y'y'} \sin^2 \psi] + \frac{qE}{k_B T} P_{y'z'} \cos \theta \sin \psi,$$

$$Q_{\psi} = \frac{\cos \psi}{\sin^2 \theta} \left\{ \frac{E^2}{k_B T} [R_{z'z'} (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{x'x'}^E) \sin^2 \theta + R_{y'y'} (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) \cos^2 \theta + R_{x'x'} (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) \cos^2 \theta] \sin^2 \theta \sin \psi + \frac{Eq}{k_B T} \sin \theta (P_{y'z'} \cos^2 \theta - P_{z'y'} \sin^2 \theta) + (R_{x'x'} - R_{y'y'}) \sin \psi (\cos^2 \theta + 1) \right\},$$

$$Q_{00} = -\frac{1}{\sin \theta} \left\{ \frac{qE}{k_B T} (P_{y'z'} - P_{z'y'}) \sin \psi \sin^2 \theta + \frac{E^2}{k_B T} R_{z'z'} (\alpha_{x'x'}^E - \alpha_{y'y'}^E) \sin^3 \theta (2 \cos^2 \psi - 1) + \frac{E^2}{k_B T} \sin \theta [R_{x'x'} (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) (\cos^2 \theta - \sin^2 \theta \cos^2 \psi) R_{y'y'} (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) + (\sin^2 \theta \sin^2 \psi - \cos^2 \theta)] \right\}$$

In order to solve Eq. (6), the function f will be expressed in the following way

$$f(\theta, \psi) = f^0 + f^E(\theta, \psi), \quad (7)$$

where f^0 is the orientational distribution function in absence of applied electric field and $f^E(\theta, \psi)$ represents the modifications due to the presence of electric field. Replacing Eq. (7) in Eq. (6), we obtain

$$\left(Q_{\theta\theta} \frac{\partial^2}{\partial \theta^2} + Q_{\psi\psi} \frac{\partial^2}{\partial \psi^2} + Q_{\psi\theta} \frac{\partial^2}{\partial \psi \partial \theta} + Q_{\theta} \frac{\partial}{\partial \theta} + Q_{\psi} \frac{\partial}{\partial \psi} + Q_{00} \right) f^E = -Q_{00} f^0. \quad (8)$$

f^0 is simply a constant because when the electric field is not present all orientations are equally probable. Therefore, the orientational distribution function is determined by solving

the differential equation given by Eq. (8) for $f^E(\theta, \psi)$. To do this, we use the finite difference method¹⁴ (FDM). First, we make a grid of discrete points θ_l, ψ_m on the domain $0 \leq \theta \leq \pi$ and $0 \leq \psi \leq 2\pi$. The number of points in the θ and ψ directions are denominated n_θ and n_ψ , respectively. Each interior grid point is generated by the following relations

$$\begin{aligned}\theta_l &= \theta_{l-1} + \Delta\theta & l &= 1, 2, \dots, n_\theta - 2 \\ \psi_m &= \psi_{m-1} + \Delta\psi & m &= 1, 2, \dots, n_\psi - 2\end{aligned}$$

with $\theta_0 = 0$, $\psi_0 = 0$, $\theta_{n_\theta-1} = \pi$ and $\psi_{n_\psi-1} = 2\pi$. The mesh size in the θ and ψ directions are $\Delta\theta = \pi/(n_\theta - 1)$ and $\Delta\psi = 2\pi/(n_\psi - 1)$, respectively. Second, using central differences, we obtain the following approximations for the values that are assumed by f^E in the grid point

$$\left. \frac{\partial f^E}{\partial \theta} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l+1,m}^E - f_{l-1,m}^E}{2\Delta\theta},$$

$$\left. \frac{\partial f^E}{\partial \psi} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l,m+1}^E - f_{l,m-1}^E}{2\Delta\psi},$$

$$\left. \frac{\partial^2 f^E}{\partial \theta^2} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l+1,m}^E - 2f_{l,m}^E + f_{l-1,m}^E}{\Delta\theta^2},$$

$$\left. \frac{\partial^2 f^E}{\partial \psi^2} \right|_{l,m} \approx \frac{f_{l,m+1}^E - 2f_{l,m}^E + f_{l,m-1}^E}{\Delta\psi^2},$$

$$\left. \frac{\partial^2 f^E}{\partial \psi \partial \theta} \right|_{l,m} \approx \frac{1}{2\Delta\theta\Delta\psi} (f_{l+1,m+1}^E + f_{l-1,m-1}^E + 2f_{l,m}^E - f_{l+1,m}^E - f_{l-1,m}^E - f_{l,m+1}^E - f_{l,m-1}^E),$$

where subscripts i, j , with $i = l, l \pm 1$ and $j = m, m \pm 1$, that accompany f^E mean that the function must be evaluated at the point θ_i, ψ_j . We will keep this nomenclature for the rest of the work.

Using these approximations for the derivatives, Eq. (8) results in the following relation

$$H_1 f_{l+1,m}^E + H_2 f_{l,m}^E + H_3 f_{l-1,m}^E + H_4 f_{l,m+1}^E + H_5 f_{l,m-1}^E + H_6 f_{l+1,m+1}^E + H_7 f_{l-1,m-1}^E = H_8 f^0, \quad (9)$$

where the coefficients H_i are given by

$$\begin{aligned}
H_1 &= \frac{Q_{\theta\theta}}{\Delta\theta^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2\Delta\theta\Delta\psi} + \frac{Q_\theta}{2\Delta\theta} \Big|_{l,m}, \\
H_2 &= -\frac{2Q_{\theta\theta}}{\Delta\theta^2} - \frac{2Q_{\psi\psi}}{\Delta\psi^2} + \frac{Q_{\psi\theta}}{\Delta\theta\Delta\psi} + Q_{00} \Big|_{l,m}, \\
H_3 &= \frac{Q_{\theta\theta}}{\Delta\theta^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2\Delta\theta\Delta\psi} - \frac{Q_\theta}{2\Delta\theta} \Big|_{l,m}, \\
H_4 &= \frac{Q_{\psi\psi}}{\Delta\psi^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2\Delta\theta\Delta\psi} + \frac{Q_\psi}{2\Delta\psi} \Big|_{l,m}, \\
H_5 &= \frac{Q_{\psi\psi}}{\Delta\psi^2} - \frac{Q_{\psi\theta}}{2\Delta\theta\Delta\psi} - \frac{Q_\psi}{2\Delta\psi} \Big|_{l,m}, \\
H_6 &= \frac{Q_{\psi\theta}}{2\Delta\theta\Delta\psi} \Big|_{l,m}, \\
H_7 &= H_6, \\
H_8 &= -Q_{00} \Big|_{l,m}.
\end{aligned}$$

When we vary subscript l from one to $n_\theta - 2$ and m from one to $n_\psi - 2$, Eq. (9) generates a system of $(n_\theta - 2) \times (n_\psi - 2)$ linear equations for the $n_\theta \times n_\psi$ values that adopt function f^E in the grid points. The remaining equations necessary to have a system with the same amount of equations and unknowns are given by the boundary conditions. Such conditions are established in terms of the probability current vector which components in the θ and ψ directions are given by

$$\begin{aligned}
J_\theta(\theta, \psi) &= \frac{E}{k_B T} \sin\theta \cos\theta f \left\{ (\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) E R_{x'x'} \cos^2\psi \sin\theta + \sin\psi \left[-P_{y'z'} q + (\alpha_{x'x'}^E - \alpha_{z'z'}^E) E \right. \right. \\
&\quad \left. \left. R_{y'y'} \sin\theta \sin\psi \right] \right\} + \sin\theta \left[(R_{x'x'} - R_{y'y'}) \cos\psi \cot\theta \sin\psi \frac{\partial f}{\partial \psi} - (R_{x'x'} \cos^2\psi + R_{y'y'} \sin^2\psi) \frac{\partial f}{\partial \theta} \right], \\
J_\psi(\theta, \psi) &= \frac{E}{k_B T} \sin\theta \cos\psi f \left\{ -P_{y'z'} q \cos\theta \cot\theta - E \left[(\alpha_{y'y'}^E - \alpha_{z'z'}^E) R_{x'x'} + (\alpha_{z'z'}^E - \alpha_{x'x'}^E) R_{y'y'} \right] \right. \\
&\quad \left. \cos^2\theta \sin\psi + \sin\theta \left[P_{z'y'} q + (\alpha_{x'x'}^E - \alpha_{y'y'}^E) E R_{z'z'} \sin\theta \sin\psi \right] \right\} - \sin\theta \\
&\quad \left(R_{z'z'} + R_{y'y'} \cos^2\psi \cot^2\theta + R_{x'x'} \cot^2\theta \sin^2\psi \right) \frac{\partial f}{\partial \psi} + (R_{x'x'} - R_{y'y'}) \cos\theta \cos\psi \sin\psi \frac{\partial f}{\partial \theta}
\end{aligned}$$

The boundary conditions for θ are $J_\theta(\theta = 0, \psi) = 0$ and $J_\theta(\theta = \pi, \psi) = 0$. By using Eq. (7) and applying the central difference approximation these conditions are given by

$$f_{0,m+1}^E - f_{0,m-1}^E = 0 \quad m = 0, 1, 2, \dots, n_\psi - 1, \quad (10)$$

$$f_{n_\theta-1,m+1}^E - f_{n_\theta-1,m-1}^E = 0 \quad m = 0, 1, 2, \dots, n_\psi - 1. \quad (11)$$

Let's note that in the two last equations we vary m from zero to $n_\psi - 1$. This means that we have introduced dummy grid points, in the sense that they do not belong to the domain of the problem. The dummy points correspond to grid expansions towards points with coordinates $\psi = \psi_0 - \Delta\psi$ and $\psi = \psi_{n_\psi-1} + \Delta\psi$, where the function has values $f_{l,-1}^E$ and f_{l,n_ψ}^E . These dummy values of f^E add $2n_\psi$ unknowns to our problem that will be eliminated after we solve the equation system because they lack physical meaning.

For the ψ variable we use periodic boundary conditions because the moments \mathbf{M}_1 and $[M_2]$ are periodic functions in ψ with period 2π ¹⁵. This implies that $f(\theta, \psi = 0) = f(\theta, \psi = 2\pi)$ and $J_\psi(\theta, \psi = 0) = J_\psi(\theta, \psi = 2\pi)$. Applying the central difference approximation and using Eq. (7) the mentioned conditions take us to the two following relations

$$f_{l,0}^E - f_{l,n_\psi-1}^E = 0 \quad l = 0, 1, 2, \dots, n_\theta - 1, \quad (12)$$

$$\begin{aligned} & \frac{1}{4\Delta\psi} [R_{y'y'} + R_{z'z'} + (R_{y'y'} - R_{z'z'}) \cos(2\theta)] (f_{l,-1}^E - f_{l,1}^E - f_{l,n_\psi-2}^E + f_{l,n_\psi}^E) \\ & + \frac{qE}{k_B T} [P_{z'y'} \sin^2 \theta - P_{y'z'} \cos^2 \theta] \sin \theta (f_{l,0}^E - f_{l,n_\psi-1}^E) = 0 \quad l = 0, 1, \dots, n_\theta - 1 \end{aligned} \quad (13)$$

Let's note that when we expand the grid and add the dummy points, Eq. (9) generates now $(n_\theta - 2) \times n_\psi$ equations that are generated doing $l = 1, 2, \dots, n_\theta - 2$ and $m = 0, 1, 2, \dots, n_\psi - 1$. Our problem is reduced, then, to solve the system of $n_\theta \times (n_\psi + 2)$ equations generated by Eqs. (9)-(13) to know the $n_\theta \times (n_\psi + 2)$ values of $f_{l,m}^E$ that the function adopts in the grid points, included the dummy ones.

Finally, to have a probability equal one of finding a particle with any orientation, the orientational distribution function that we obtain must be normalized in the following way

$$f(\theta, \psi) = \frac{f^0 + f^E(\theta, \psi)}{2\pi \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (f^0 + f^E) \sin \theta d\theta d\psi}. \quad (14)$$

As f^0 is an arbitrary constant we choose $f^0 = 1$ to make the calculations.

C. Reduced electric linear dichroism

The electric reduced dichroism (RELD) is defined as

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A}, \quad (15)$$

where $A_{//}$ and A_{\perp} are the solution absorbances for linearly polarized incident light according to the parallel and perpendicular directions of the applied electric field and A is the absorbance of the solution for randomly oriented molecules. The subscripts $//$ and \perp will be kept for the rest of the work with the same meaning used above.

In the present work, we will deduce an expression for RELD of bent rod DNA fragments carrying out a similar treatment to the one applied by Bertolotto et al.¹⁰. The procedure is based on a work by Schellman¹⁶. He uses quantum theory of absorption to determine that the extinction coefficient and, therefore, the absorbance of a system of monomer units with fixed orientation is proportional to $|\mathbf{p} \cdot \mathbf{E}|^2$, where \mathbf{p} is the monomer unit transition moment and \mathbf{E} the electric field of the incident light. This result can be applied to system of polymers without fixed orientation. Supposing that the interaction among the different chromophore groups (monomer units) in the polymer is weak enough as to omit the interaction between them, the reduced electric dichroism results

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\langle w_{//} \rangle - \langle w_{\perp} \rangle}{\langle w \rangle}, \quad (16)$$

where

$$w_{//} = \sum_{i=1}^N |\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{E}_{//}|^2, \quad (17)$$

$$w_{\perp} = \sum_{i=1}^N |\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{E}_{\perp}|^2, \quad (18)$$

$$w = \sum_{i=1}^N |\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{E}|^2. \quad (19)$$

The summatories in the above equations are over all the chromophore groups in the BRM. The brackets in Eq. (16) mean statistical average on all the orientations. $w_{//}$ and w_{\perp} must be

averaged having into account that there is an applied electric field while w must be averaged for random orientation. In the last case, it is the same to consider linearly polarized light according to the parallel or perpendicular directions to the applied electric field, therefore no subscript $//$ or \perp has been included in Eq. (19).

Being $X''Y''Z''$ a system of coordinates with its Z'' axis tangent at the arc in the point at which the chromophore group i is located (Fig. 1). Transition moment \mathbf{p}_i , in this system, is given by

$$\mathbf{p}_i = (p \cos \beta \quad p \sin \beta \quad 0), \quad (20)$$

where β is the angle that projects \mathbf{p}_i on the axes X'' and Y'' , respectively. The component of \mathbf{p}_i according to Z'' is zero because the electronic transitions are produced in the DNA basis plane. In the body coordinate system the transition moment of the chromophore group i is

$$\mathbf{p}_i = (p \cos \beta \sin \gamma_i \quad p \sin \beta \quad -p \cos \beta \sin \gamma_i). \quad (21)$$

We transform Eq. (21) to the laboratory coordinate system with the Euler transformation matrix and develop Eqs. (17)-(19) in the already mentioned coordinate system. To do this, the angle γ_i is expressed as $\gamma_i = -\gamma_o + (i-1/2)b/R$, where b is the distance between two consecutive chromophore groups in the BRM. The result is averaged in the angle β with probability density $1/2\pi$ to consider that the transition moments are randomly oriented in the basis plane. Then, we applied the approximation $\cot(b/R) \cong R/b$ in the obtained expressions for $w_{//}$, w_{\perp} and w , and replaced them in Eq. (16). Thus, the RELD results

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{3\pi}{16\gamma_o} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} [(-\gamma_o - 3A_o)(1 + 3\cos 2\theta) - 6(-\gamma_o + A_o)\cos 2\psi \sin^2 \theta] f(\theta, \psi) \sin \theta d\theta d\psi, \quad (22)$$

where $A_o = \cos \gamma_o \sin \gamma_o$.

In Eq. (22) the statistical average in the angle ϕ has been evaluated. This can be done because the orientational distribution function is independent from this angle.

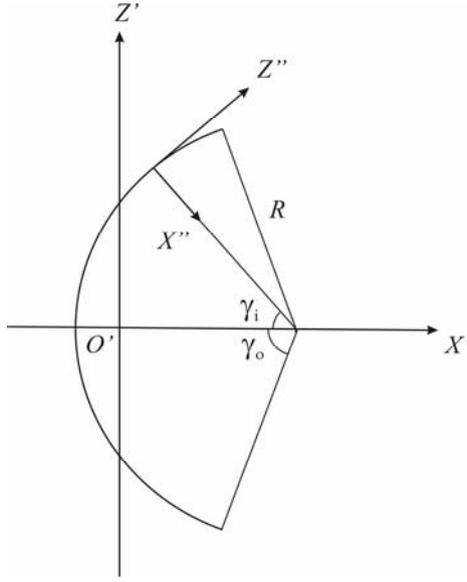


FIG. 1. Bent rod molecule (BRM) in the body coordinate system

III. RESULTS AND DISCUSSION

First, we calculated the RELD of DNA fragments of 179 pb using the BRM model with a bending angle of 116° , an arc length of 608.6 \AA and a diameter of 24 \AA . The hydrodynamic parameters used to characterize the fragments were obtained applying the Hydro++ program by Garcia de la Torre¹⁷. To know the orientational distribution function we solved the Fokker-Planck equation through the FDM as was described in section II.B using a grid with $n_\theta = n_\psi = 75$. The electric polarizability constant used is $K = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}$ and the values assigned to the electric charge is $q = 0.16Q$, where Q is the DNA fragment charge when all the phosphate groups are ionized. The electric polarizability values corresponding to that assigned to K are shown in Table 1 for the different bending angles that were used in the present work.

Table. 1. Principal elements of $[\alpha^E]$ tensor

$2\gamma_0$ ($^\circ$)	$\alpha_{x'x'}^E \times 10^{17}$ (cm^3)	$\alpha_{y'y'}^E \times 10^{17}$ (cm^3)	$\alpha_{z'z'}^E \times 10^{16}$ (cm^3)
120	8.523	6.086	2.712
116	8.387	6.086	2.769
100	7.863	6.086	2.987
80	7.269	6.086	3.229
60	6.772	6.086	3.430

Fig. 2 shows stationary RELD values as function of the applied electric field for BRM with the above mentioned parameters. Fig. 2 also shows the individual contributions to RELD for orientations only due to the induced electric dipolar moment-electric field interaction and only to the translation-rotation hydrodynamic coupling. In the first case, the molecules tend to orientate in parallel direction to the electric field which gives us a negative dichroism component. In the second case, the molecules tend to orientate in perpendicular direction to the electric field and thus, the dichroism is positive due to hydrodynamic coupling. This positive component causes the inversion of the habitual negative sign in the electric dichroism at low electric field. When the electric field strength rises, the electric dichroism reaches negative values associated to an intense component due to electric polarizability. However, we observe that the contribution due to hydrodynamic coupling remains in all the electric field strength range that is shown in Fig. 2. The results clearly show that the contributions to RELD originated in the orientation due to electric polarizability and hydrodynamic coupling are not additive.

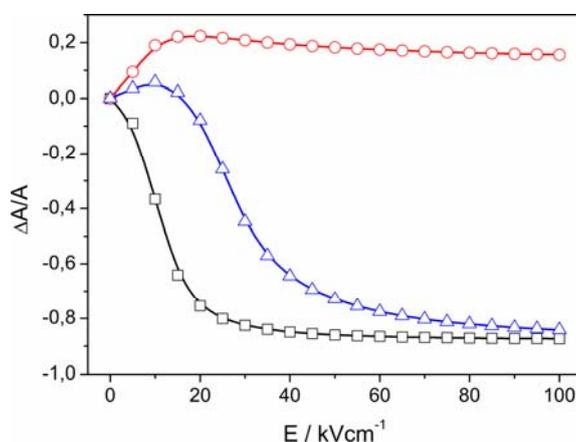


FIG. 2. Stationary RELD as function of the electric field strength of BRM solution. (-□-) orientation due electric polarizability, (-○-) orientation due hydrodynamic coupling, (-Δ-) orientation due electric polarizability and hydrodynamic coupling combined.

In Fig. 3 we observe the effect of changing the BRM bending angle on the electric dichroism. When the bending angle rises, the positive component of the electric dichroism associated to hydrodynamic coupling becomes more important. Consistently, we observe that for higher bending angles (100° and 120°) the electric dichroism at low electric field is positive while for lower bending angles (60° and 80°) the electric dichroism is negative in all

the range of electric field analyzed. The latter does not mean that it does not exist a contribution due to translation-rotation coupling for bending angles equal to 60° and 80° but that the mentioned contribution is not intense enough as to achieve the sign inversion in the electro-optical signal.

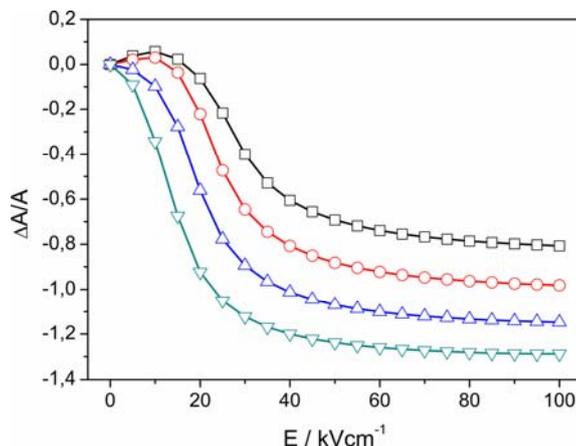


FIG. 3. Stationary RELD as function of the electric field strength of BRM with different bending angles. (-□-) 120°, (-○-) 100°, (-△-) 80°, (-▽-) 60°.

In Fig. 4 we show the results obtained for RELD as function of the electric field for BRM with the same orientational parameters, i. e. the same conformation, electric charge and electric polarizability, used by Antosiewicz and Porschke¹² together with the results obtained by them through Brownian dynamic simulation. Fig. 4 shows that the results from both calculations qualitatively agree. However, there is an apparently quantitative disagreement that will be explained in the following lines. Although the orientation process is the same in both calculations the optical characterization of BRM is not exactly equal. Antosiewicz and Porschke¹² used an extinction coefficient tensor which elements in the body coordinate system are $\varepsilon_{x'} = 0.35507$, $\varepsilon_{y'} = 0.4665$ and $\varepsilon_{z'} = 0.17842$ (normalized to trace = 1). These authors estimated these values based on a previous work¹⁸. In the present work, we characterized the optical properties of BRM using the transition moment \mathbf{p} of each chromophore group (Eq. (20)). Equivalently, we can describe the BRM with its extinction coefficient, which is proportional to the sum of $\mathbf{p}^t \mathbf{p}$ over all the chromophore groups, where the superscript t means transpose. For our model, developed considering that the BRM is a discrete chain of chromophore units, each of which is described with a transition moment that is randomly oriented in the corresponding basis plane, the elements of extinction coefficient

tensor are $\varepsilon_x = 0.36098$, $\varepsilon_y = 0.5$ and $\varepsilon_z = 0.13901$ (normalized to trace = 1). These values are slightly different than those used by Antosiewicz y Porschke¹². If we, besides using the same orientational parameters than Antosiewicz and Porschke¹², use the same extinction coefficient tensor, the results of both calculation procedures really agree (Fig. 5). In this way, the study of the orientation process here developed coincides with those of Antosiewicz and Porschke¹², being the differences of RELD values attributed to use of different optical parameters to describe the BRM. Nowadays, the question about which optical model is more adequate to describe DNA fragments is difficult to answer. To conclude about this point it would be necessary to have experimental data of saturation electric dichroism of short DNA fragments in aqueous solution.

The two curves shown in Fig. 5 represent the result to the same problem studied by different methods: theory and computational simulation. Besides differing in the method of study both works differ in the reference system used to describe the physical problem. In the present work, the body coordinate system is chosen with its origin in the center of mass while Antosiewicz and Porschke¹² use the origin in the center of diffusion. It is convenient to make some considerations respect to the election of the origin of the body coordinate system. For DNA fragments it is habitual to consider that the centers of positive and negative charges agree with the center of mass. This means that the molecules are considered non polar and that they lack permanent electric dipolar moment. However, as the system is not neutral, there exists a permanent electric moment, or permanent electric dipolar quasi-moment, non null if we calculate it with respect to a system with a different origin to the center of charge¹⁹. In the present work, the origin of the body coordinates system coincides with the center of charge of the BRM and, therefore, no electric moment has been considered. On the contrary, Antosiewicz and Porschke¹² use the body coordinate system with origin in the center of diffusion and that is why they include this quasi-permanent moment. The equivalence between both descriptions was proved by Bertolotto⁹. He found that the contribution to RELD of translation-rotation coupling of molecules with the origin of the body coordinate system in their center of charge results, when the origin of the body coordinate system coincides with the center of diffusion, in an electric moment contribution that is balanced by the changing of the translation-rotation coupling tensor due to the change of the origin. The concordance between the results shown in Fig. 5 corroborates the equivalence of both elections for the origin of the body coordinate system.

The numerical calculation procedure for RELD implemented in this work is a practical alternative to determine molecular parameters fitting experimental curves of RELD as function of electric field strength. For this purpose, the numerical calculation procedure here developed is more convenient than computational simulation because the first one is less time-consuming.

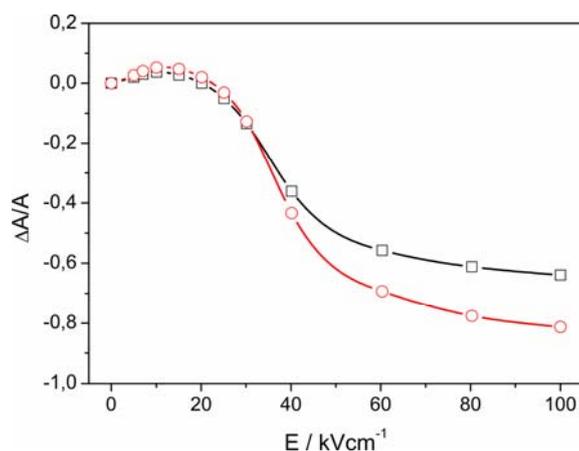


FIG. 4. Stationary RELD as function of the electric field strength of BRM solution with the same orientational parameters used by Porschke and Antosiewicz¹². (-□-) values obtained by Porschke and Antosiewicz¹² with Brownian dynamic simulation, (-○-) values obtained solving Fokker-Planck equation with MDF.

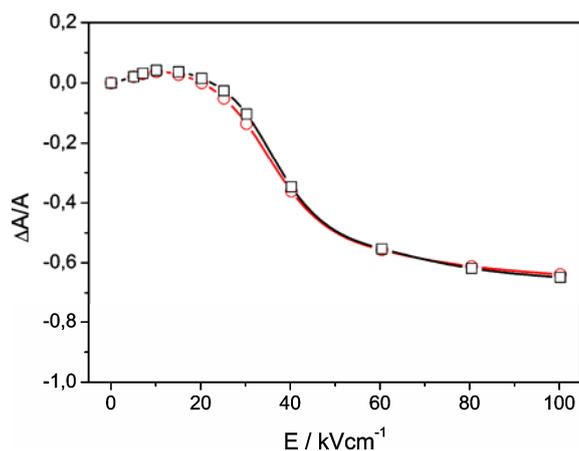


FIG. 5. Stationary RELD as function of the electric field strength of BRM solution with the same orientational and optical parameters used by Porschke and Antosiewicz¹². (-□-) values obtained by Porschke and Antosiewicz¹² with Brownian dynamic simulation, (-○-) values obtained solving Fokker-Planck equation with MDF.

To estimate the error in the numeric calculation when we solve the Fokker-Planck equation through FDM, we studied the particular case in which $q = 0$. Under this circumstance, the

system is conservative and the distribution function in the stationary state is the Boltzmann distribution function. Fig. 6 shows that RELD curves calculated employing the Boltzmann distribution function and the numerical solution of the Fokker-Planck equation agree well enough in the electric field strength range studied. The percent relative error is shown in Fig. 7. This is maximum for the lower electric field strength (1kV/cm) and rapidly decreases when the applied electric field rises. In this way, the error in the numerical calculation is comparable to experimental errors.

The numeric calculation of RELD was also proved to reproduce the values obtained through the analytic calculations reported by Bertolotto and others¹⁰ for $q \neq 0$ in the limit of low electric fields (up to 2 kV/cm).

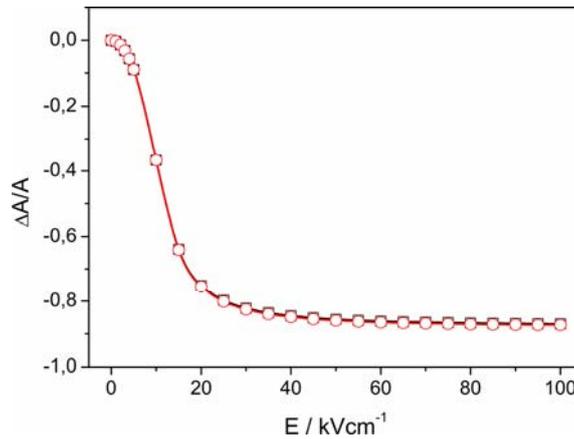


FIG. 6. Stationary RELD as function of the electric field strength of BRM solution with the following parameters: $q=0$ and $K=1 \times 10^{-5} \text{ cm}$. (\square) values obtained using the Boltzmann distribution function, (\circ) values obtained solving Fokker-Planck equation for the distribution function.

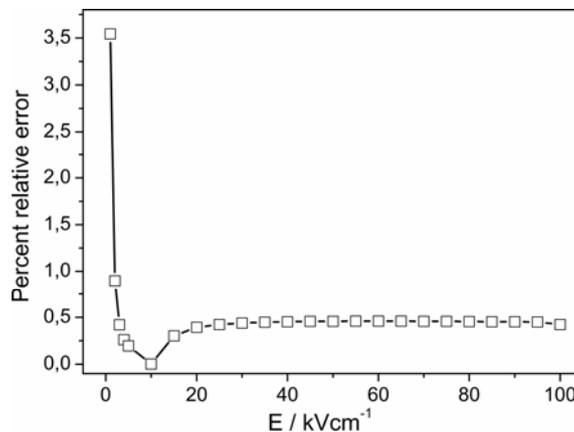


FIG. 7. Absolute value of percent relative error between the results of RELD shown in Fig. 5.

IV. CONCLUSIONS

In the present work we corroborate that the translation-rotation hydrodynamic coupling generate a relatively intense positive component in the stationary electric dichroism of bent rod DNA fragments. Although this positive component is very important for low electric field because it explains dichroism sign, its contribution is meaningful for a wide range of electric field strengths. Results show that the hydrodynamic coupling effect on the electric dichroism is higher when the fragments' symmetry diminishes. Some of the results here obtained agree with those reported on current bibliography. However, there is a difference between the present work and the already existing ones. The latter can be classified in two groups that differ in the study techniques. On the one hand, the ones that apply Brownian dynamic simulation and on the other, the ones that apply theoretical methods which results are applicable in the limit of low electric field. Respect to the first group the difference lies in the use of completely different study techniques, theory and computational simulation, while respect to the second group it agrees with the use of theoretical methods but it is applicable to higher electric fields.

The calculation procedure for RELD here proposed requires a little computational time. Thus, in the cases of DNA fragments short enough to consider them as rigid particles, the mentioned procedure is a useful tool to determine molecular parameters fitting experimental data of RELD as function of electric field strength.

Acknowledgments

J. P. Umazano is fellow of Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) and wishes to thank this Institution. He also wishes to thank Prof. Dr. J. R. Grigera for contributing to his formation as a researcher.

¹H. Brenner, Chem. Eng. Sci. **19**, 599 (1964).

²W. A. Wegener, R. M. Dowben and V. J. Koester, J. Chem. Phys. **70**, 622 (1979).

³W. A. Wegener, J. Chem. Phys. **84**, 5989 (1986).

⁴W. A. Wegener, J. Chem. Phys. **84**, 6005 (1986).

⁵Y. P. Kalmykov, J. Chem. Phys. **131**, 074107 (2009).

⁶J. A. Bertolotto, G. B. Roston, M. E. Ascheri and M.G. Campo, Physica A. **327**, 185 (2003).

⁷J. A. Bertolotto, G. B. Roston and M. E. Ascheri, Progr. Colloid and Polym. Sci. **128**, 25

(2004).

⁸J. A. Bertolotto, G. B. Roston, G. M. Corral, and M. E. Ascheri, AIP Conf. Proc. **913**, 151 (2007).

⁹J. A. Bertolotto, Physica A, **373**, 29 (2007).

¹⁰J. A. Bertolotto, G. M. Corral, E. M. Farias de La Torre, G. B. Roston, J. Phys.: Condens. Matter. **22**, 494101 (2010).

¹¹D. Porschke, Biophys. Chem. **49**, 127 (1994).

¹²D. Porschke and M. Antosiewicz, J. Phys. Chem. **109**, 1034 (2005).

¹³M. Antosiewicz and D. Porschke, J. Phys. Chem. **113**, 13988 (2009).

¹⁴L. Collatz, *The numerical treatment of differential equations* (Springer-Verlag, Berlin, 1966).

¹⁵H. Risken, *The Fokker-Planck equation* (Springer-Verlag, Berlin, 1989).

¹⁶J. A. Schellman, Chem. Rev. **75**, 323 (1975).

¹⁷J. García de la Torre, G. del Rio and A. Ortega, J. Phys. Chem. B. **111**, 955 (2007).

¹⁸M. Antosiewicz and D. Porschke, J. Biomol. Struct. Dyn. **5**, 819 (1988).

¹⁹C. J. F. Böttcher, *Theory of electric polarization* (Elsevier, Amsterdam, 1973).