



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Nous desenvolupaments,  
aplicacions bioanalítiques i  
validació de mètodes de  
resolució multivariant**

**Joaquim Jaumot Soler**

**Tesi Doctoral  
20 de juny de 2006**



## Capítol 3

### Procediments experimentals i instrumentació



### **3.1. Realització dels experiments**

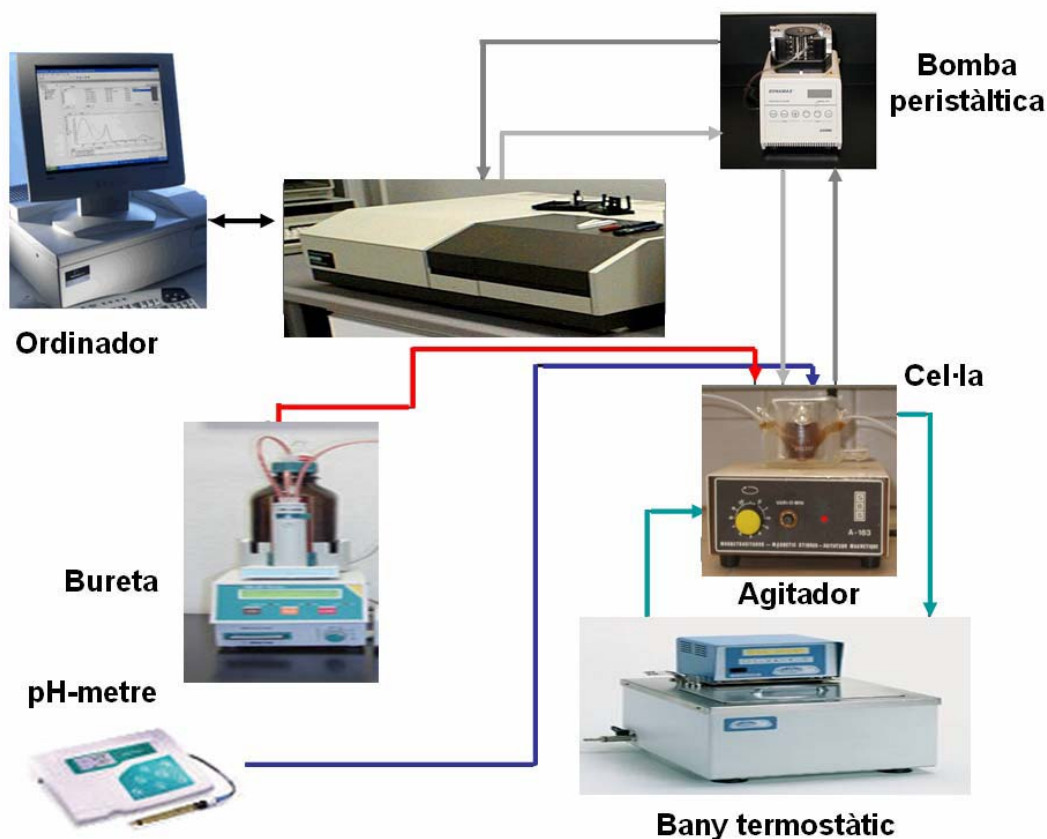
Els estudis experimentals que s'han dut a terme en aquesta Tesi Doctoral s'han basat en els procediments que es detallen a continuació.

#### **Valoracions àcid-base**

Les valoracions àcid-base s'han fet amb l'objectiu de produir transicions entre les conformacions diferents dels oligonucleòtids estudiats en funció del pH i per determinar les constants d'equilibri que regeixen els equilibris corresponents [1].

Les valoracions àcid-base es van seguir mitjançant les tècniques espectroscòpiques d'absorció molecular, de dicromisme circular i de Ressonància Magnètica Nuclear. Les valoracions seguides per absorció molecular o dicromisme circular s'han dut a terme col·locant la mostra i l'elèctrode a l'interior d'una cel·la de valoració de doble paret per la qual circula, externament, aigua a la temperatura desitjada. Mitjançant una autobureta, una micropipeta o un capil·lar s'addiciona una solució concentrada d'àcid (HCl) o base (NaOH) que ens permet variar el pH amb un canvi negligible en el volum total de solució. A cadascun dels valors de pH de treball es registra un espectre complet de la solució. En el cas de les valoracions seguides per absorció molecular es fa circular la solució des de la cel·la de valoració cap a una cubeta de flux en l'espectrofotòmetre mitjançant una bomba peristàltica. Aquesta possibilitat no existeix en el cas de seguir el procés mitjançant dicromisme circular degut a impediments instrumentals i, per tant, es van prendre manualment al·lquotes de mostra i es va registrar l'espectre.

A continuació es mostra esquemàticament el muntatge necessari per dur a terme una valoració en continu.



**Figura 3.1.** Esquema del muntatge experimental necessari per dur a terme una valoració en continu.

### Experiments de variació de la força iònica

Els experiments de variació de la força iònica s'han fet servir per tal de determinar les condicions salines en les quals es poden formar determinades conformacions dels oligonucleòtids [2].

El muntatge experimental necessari per dur a terme aquests experiments és pràcticament idèntic a l'utilitzat en el cas de valoracions àcid-base. La única diferència radica que, en comptes d'utilitzar com a solucions valorants àcids o bases fortes, s'utilitzen solucions salines altament concentrades com a valorants. Depenent de l'equilibri estudiat s'han utilitzat diferents medis salins per tal d'observar els seus efectes.

### **Experiments de desnaturalització tèrmica**

Els experiments de desnaturalització tèrmica (*melting*) s'han fet servir per estudiar la influència de la temperatura sobre la conformació dels àcids nucleics estudiats [3]. Aquests experiments s'han seguit espectroscòpicament mitjançant les tècniques d'absorció molecular, fluorescència i dicroisme circular.

Experimentalment, es col·loca la mostra d'àcid nucleic en una cubeta tapada amb un tap reforçat amb tefló a l'interior d'un espectrofotòmetre acoblat a un controlador de temperatura. En aquesta Tesi s'han fet servir dos tipus diferents de controladors de temperatura: els basats en un bany d'aigua i els basats en l'efecte *Peltier* [4]. En ambdós casos la temperatura varia, en general, a una velocitat de 0,6 °C/min per tal de que els canvis de temperatura no siguin massa bruscs i es permeti arribar a l'equilibri en cada temperatura. En tots els casos es registra un espectre complet cada 3 °C, els quals es guarden pel seu anàlisi posterior.

En alguns casos, en acabar l'experiment de desnaturalització, s'ha dut a terme el procés invers de canvi de temperatura, conegut com renaturalització, per tal de comprovar la reversibilitat del procés [1].

### **Experiments cinètics i de mescles dinàmiques**

Els experiments cinètics s'utilitzen pel seguiment de l'evolució d'un procés afectat per la variable temps mantenint controlades i estables la resta de variables experimentals. En aquest tipus d'experiments es registren espectres en les condicions inicials a temps igual a zero i, posteriorment, a determinats temps de reacció. A partir del coneixement de les condicions inicials (concentracions dels reactius, presència de catalitzadors, ...) es podrà postular un model cinètic i extreure informació com ara les constants de velocitat de les etapes que formen el mecanisme de reacció.

Els experiments de mescles dinàmiques s'han fet per simular a escala de laboratori els experiments de mescla o *blending* que es duen a terme a les refineries [5]. Per tal de realitzar aquests experiments es va partir d'una barreja inicial de benzines i, mitjançant una bomba peristàtica de quatre canals, es van afegir volums variables de benzines al

mateix temps que s'extreia de la mescla de reacció el volum necessari per tal de mantenir constant el volum total de reacció. L'adquisició de les dades espectroscòpiques es va dur a terme, en el cas del treball realitzat en aquesta Tesi, mitjançant una sonda de transmitància NIR.

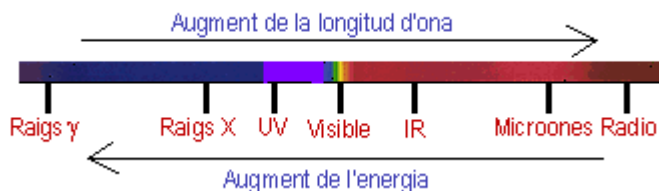
### 3.2. Tècniques instrumentals

A continuació, es descriuen els fonaments teòrics de les tècniques instrumentals utilitzades en aquesta Tesi així com les seves aplicacions i els instruments que s'han fet servir.

#### Absorció molecular a l'ultraviolat i al visible

##### *Fonaments teòrics*

La radiació electromagnètica es representa habitualment com l'oscil·lació sinusoidal d'un camp magnètic i elèctric en fase perpendicular i en la direcció de propagació. En aquest treball únicament es considera el component elèctric de la radiació electromagnètica. Per entendre les interaccions entre la radiació i la matèria es fa necessari postular que la radiació es compon per paquets d'energia anomenats fotons. Aquests fotons tenen una energia ( $E$ ) que ve determinada per  $E=h \cdot \nu$ , on  $h$  és la constant de Planck i  $\nu$  la freqüència de la radiació [6]. D'aquesta forma es pot definir l'espectre electromagnètic (Figura 3.2.).



**Figura 3.2.** Representació de l'espectre electromagnètic.

Les transicions entre dos estats electrònics es produiran quan, a la molècula irradiada, la freqüència de la radiació incident coincideixi amb la diferència d'energia entre dos estats electrònics, de forma que un electró d'un estat fonamental (energia baixa) passarà a un estat excitat (energia alta). Quan la radiació passi a través d'un sòlid, un

líquid o un gas algunes freqüències de la radiació poden eliminar-se selectivament per absorció. Durant aquest procés d'absorció les partícules van del seu estat fonamental a un o varis estats excitats. La relació logarítmica entre la intensitat de la radiació que arriba a la cel·la ( $I_0$ ) i la intensitat que surt ( $I$ ) es defineix com l'absorbància i ve donada per:

$$A = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) \quad \text{Equació 3.1.}$$

De la mateixa forma es pot definir la transmitància que correspon a la fracció de la radiació incident que és transmesa per la radiació,  $T = \frac{I}{I_0}$ , la qual es pot relacionar amb l'absorbància de la forma següent:

$$A = -\log_{10} T \quad \text{Equació 3.2.}$$

Si es fa servir radiació monocromàtica, aquesta absorció (coneguda com absorbància) és directament proporcional al camí òptic del medi ( $l$ ) i a la concentració ( $c$ ) de les espècies absorbents, el que es coneix com la llei de Lambert-Beer. Aquesta llei es pot escriure com:

$$A = a \cdot c \cdot l \quad \text{Equació 3.3.}$$

on  $a$  és una constant de proporcionalitat coneguda com absorptivitat. La seva magnitud i dimensions depenen de la concentració i del camí òptic, encara que usualment s'utilitzen les unitats de  $l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Si la concentració s'expressa en mols per litre aleshores, a s'anomena absorptivitat molar i rep el símbol  $\epsilon$  i les unitats de  $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$  donant lloc a l'equació següent:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Equació 3.4.}$$

#### *Aplicació de l'absorció molecular a l'estudi dels àcids nucleics*

En els grups constituents dels nucleòtids (hidrats de carboni, bases nitrogenades i grups fosfats) hi ha diversos grups funcionals que poden presentar el fenomen



d'absorció de la radiació [2]. Així, els grups fosfat tenen transicions electròniques a energies molt elevades (longituds d'ona menors de 170 nm). Els sucres, per la seva part, tenen bandes d'intensitat molt baixa que comencen a observar-se a longituds d'ona al voltant de 190 nm. Així, els cromòfors que s'observen per sobre de 190 nm han de provenir de les bases nitrogenades que posseeixen un gran nombre d'orbitals electrònics  $\pi$  als anells aromàtics, la qual cosa implica l'existència de gran quantitat de possibles transicions  $\pi-\pi^*$ . Aquestes transicions es troben a longituds d'ona entre 200 i 300 nm i tenen una intensitat elevada. Com es veu a la Taula 3.1., les bases nitrogenades tenen absortivitats elevades i absorbeixen a longituds d'ones semblants.

**Taula 3.1.** Longitud d'ona d'absorció i absortivitat de les bases nitrogenades a pH àcid i a pH bàsic [2].

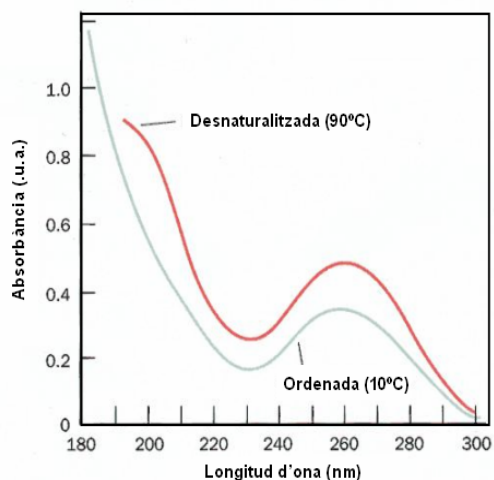
Nucleòsid	pH 1-2		pH > 11	
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$10^{-4} \times \epsilon$	$\lambda_{\max}$ (nm)	$10^{-4} \times \epsilon$
Adenosina 5'-P	257	1,50	259	1,54
Guanosina 3'-P	257	1,22	257	1,13
Citidina 3'-P	279	1,30	272	0,89
Timidina 5'-P	267	1,00	267 *	1,00
Uridina 2'-P	262	0,99	261	0,73

\* pH = 7,0

En el cas de les estructures ordenades dels polinucleòtids, els espectres obtinguts seran la suma de les contribucions individuals de cada unitat de base nitrogenada més l'efecte de les interaccions entre els nucleòtids. D'aquesta forma, s'observarà una banda a longituds d'ona similars a les de la Taula 3.1. però l'absorció d'una estructura dúplex serà menor que la d'una cadena simple i, al mateix temps, l'absorció de la cadena simple serà menor que l'absorció de la suma dels seus nucleòtids. Aquests canvis cromàtics es fan servir per seguir les transicions conformacionals dels àcids nucleics [1, 3]. Així, s'utilitza l'absorció molecular a l'ultraviolat per estudiar les transicions que impliquen una variació en l'ordenament dels àcids nucleics. Aquesta variació pot provocar un canvi hiperocròmic (augment de l'absorbància en augmentar el grau de desordre del sistema, com es pot veure a la Figura 3.3.) o hipocròmic (disminució de l'absorbància en augmentar l'ordenació del sistema). Aquests canvis

hipercròmics o hipocròmics són deguts als canvis en l'estat electrònic dels grups heterocíclics de les bases nitrogenades induïts per modificacions químiques, pèrdua d'apilament entre bases, trencament d'enllaços per pont d'hidrogen o per reaccions de protonació/desprotonació.

Com es veu a la Taula 3.1., la majoria d'aquestes transicions, tant a pH àcid com a pH bàsic, es produeixen a l'interval de longituds d'ona comprés entre 255-280 nm. Per aquest motiu, en la majoria de treballs existents en la bibliografia, el seguiment de les transicions conformacionals dels àcids nucleics s'ha fet a una única longitud d'ona, que acostuma a ser 260 nm. Com es pot veure a la Figura 3.3., aquesta és la longitud d'ona a la qual hi ha el màxim d'absorbància, tant per a les estructures ordenades com per a les estructures desnaturalitzades [2].



**Figura 3.3.** Canvi hipercròmic en un experiment de desnaturalització tèrmica.

### Instrumentació

En aquesta Tesi s'ha utilitzat l'espectrofotòmetre Perkin-Elmer Lambda19. El control de la temperatura s'ha dut a terme mitjançant un sistema digital de control de la temperatura Perkin-Elmer C570-0701 basat en l'efecte Peltier.



**Figura 3.4.** Espectrofotòmetre Perkin-Elmer Lambda19.

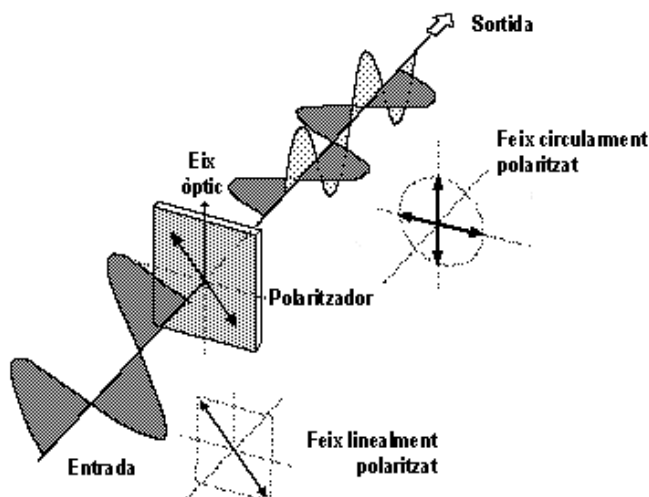
Aquest instrument es troba al Laboratori de Quimiometria del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

## **Dicroisme circular**

### *Fonaments teòrics*

L'activitat òptica es manifesta pràcticament en tots els productes naturals, com són els àcids nucleics, les proteïnes o els sucres. La millor tècnica per mesurar mostres amb activitat òptica és la espectroscòpia de dicroisme circular, la qual permet observar les transicions conformacionals d'aquestes macromolècules. Com que els àcids nucleics poden assolir diverses conformacions depenent de les condicions ambientals, el dicroisme circular és una eina de gran interès per seguir aquests tipus de processos [7-9].

La teoria del dicroisme circular va ser desenvolupada per Biot i Fresnel al segle XIX [10, 11]. En aquesta, a diferència de l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat, la radiació que incideix a la mostra es troba polaritzada en un pla format per dos components circularment polaritzats: un a la dreta i l'altre a l'esquerra. Aquests dos components es troben en fase i són de la mateixa amplitud. Es pot observar la diferència entre la polarització de la radiació abans i després de passar pel polaritzador a la Figura 3.5.



**Figura 3.5.** Procés de polarització de la llum.

Quan un feix de llum passa per un medi òpticament actiu (com poden ser els àcids nucleics o les proteïnes) cadascun dels seus components circularment polaritzats interactua de forma diferent amb els centres quirals de les molècules presents. La interacció de la radiació amb aquests centres quirals indueix un desfasament i un canvi de magnitud diferencial en els dos components circularment polaritzats de la radiació. Aquests fenòmens provocaran que l'absorció de la llum circularment polaritzada a la dreta i l'absorció de la llum circularment polaritzada a l'esquerra sigui diferent i, per

tant,  $\epsilon_{\text{esquerra}} \neq \epsilon_{\text{dreta}}$ . La diferència  $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{esquerra}} - \epsilon_{\text{dreta}}$  és el que s'anomena senyal de dicroisme circular [7].

En un medi òpticament actiu es poden observar dues absorpcions diferents de la llum polaritzada, per la qual cosa l'Equació 3.1. podrà tenir dues formes diferents. La primera d'aquestes formes serà per a l'absorció de la llum polaritzada cap a la dreta:

$$A_{\text{dreta}} = \log_{10} \left( \frac{I_o}{I_{\text{dreta}}} \right) \quad \text{Equació 3.5.}$$

i la segona forma serà per a l'absorció de la llum polaritzada cap a l'esquerra:

$$A_{\text{esquerra}} = \log_{10} \left( \frac{I_o}{I_{\text{esquerra}}} \right) \quad \text{Equació 3.6.}$$

En els instruments de dicroisme circular es canvia periòdicament la polaritat de la llum que entra en el medi i la diferència d'absorbàncies es mesura directament com:

$$\begin{aligned} \Delta A &= A_{\text{esquerra}} - A_{\text{dreta}} = \log_{10} \left( \frac{I_o}{I_{\text{esquerra}}} \right) - \log_{10} \left( \frac{I_o}{I_{\text{dreta}}} \right) = \\ &= \log_{10} \left( \frac{I_{\text{dreta}}}{I_{\text{esquerra}}} \right) \end{aligned} \quad \text{Equació 3.7.}$$

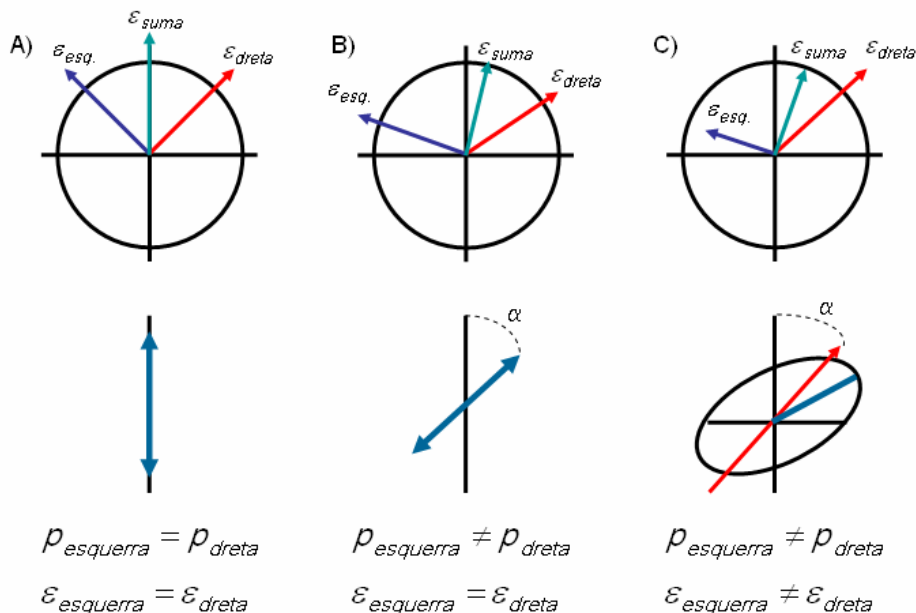
A partir d'aquesta equació es pot obtenir el valor del senyal de dicroisme circular  $\Delta\epsilon$ :

$$\Delta\epsilon = \frac{1}{c l \Delta A} \quad \text{Equació 3.8.}$$

D'aquesta equació es deriva que la mesura final no depèn de la intensitat incident ( $I_o$ ), de forma que no és necessari tenir un feix de referència en els instruments de dicroisme circular.

El dicroisme circular provoca un altre efecte, anomenat el·lipticitat. Al sortir de la cel·la de mesura tenim que  $I_{\text{esquerra}} \neq I_{\text{dreta}}$  degut a la distorsió del pla de polarització. Si es

construeix el vector suma per a cada angle, aleshores s'observa que es descriu una el·lipse de forma que la llum ha passat a estar el·lípticament polaritzada (veure Figura 3.6.).



**Figura 3.6.** Representació del fenomen de dicromisme circular on  $\alpha$  correspon a l'angle de rotació,  $\epsilon_{esquerra}$  i  $\epsilon_{dreta}$  als vectors que representen el senyal de dicromisme circular en les dues direccions, i  $p_{esquerra}$  i  $p_{dreta}$  representen les direccions d'aquests vectors. (a) Vectors dels components de la llum abans d'arribar a la mostra on s'observa el desdoblament de la radiació polaritzada (b) Vectors dels components de la llum després d'interactuar amb la mostra, fora de fase i al mateix pla de polarització. (c) Vectors dels components de la llum després d'interactuar amb la mostra, fora de fase i el pla de polarització distorsionat un angle  $\alpha$  que dona lloc a la llum el·lípticament polaritzada.

La rotació mesurada depèn del nombre de molècules quirals que hi ha contingudes a la cel·la. Alhora, és directament proporcional a la longitud d'aquesta i a la densitat de la mostra. Es pot definir com:

$$\alpha = \kappa \rho l \tag{Equació 3.9.}$$

i, si  $\rho$  s'expressa en g/cm<sup>3</sup>, es defineix la rotació específica:

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l\rho} \tag{Equació 3.10.}$$

Moscowitz [12] va introduir definicions anàlogues tractant l'el·lipticitat com una rotació. Així, l'el·lipticitat específica:

$$[\Psi] = \Psi = \rho \lambda \quad \text{Equació 3.11.}$$

i l'el·lipticitat molar:

$$[\Theta] = [\Psi] \frac{M}{100} \quad \text{Equació 3.12.}$$

Per a valors d'el·lipticitat molt petits (cas general, si es treballa en medi líquid) es pot aproximar a:

$$[\Theta] = 3300 \Delta \epsilon \quad \text{Equació 3.13.}$$

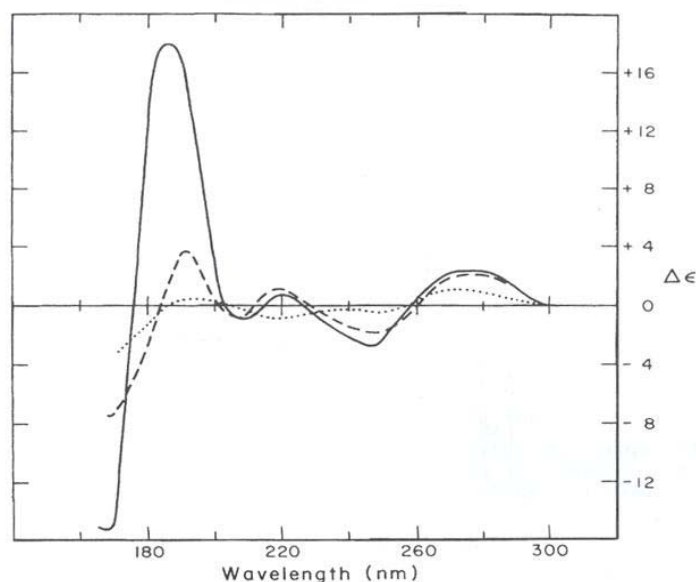
Al mesurar la diferència entre les intensitats absorbides per la mostra en les dues direccions de la llum polaritzada, els senyals que obtindrem podran ser tant positius com negatius .

#### *Aplicació del dicroisme circular a l'estudi dels àcids nucleics*

Les bases aromàtiques no tenen activitat òptica intrínseca donat que tenen un pla de simetria. Per la seva banda, els sucres són asimètrics i, com que les bases estan enllaçades al carboni 1' dels sucres, aquests últims poden induir dicroisme circular a les bandes d'absorció de les bases. Malgrat això, la intensitat d'aquest dicroisme circular és relativament baixa perquè es tracta d'un efecte secundari basat en la inducció de la asimetria [8].

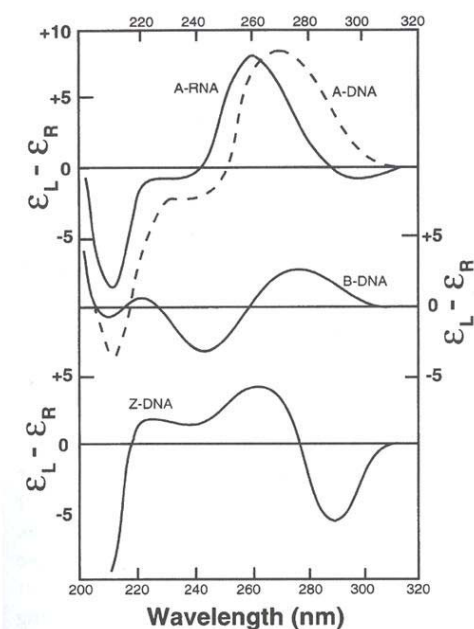
La raó de l'activitat òptica observada experimentalment en els àcids nucleics rau en la seva estructura helicoïdal. Les bases aromàtiques són hidrofòbiques i tenen tendència a interaccionar entre elles per tal de minimitzar les repulsions entre els electrons  $\pi$  i el solvent. D'altra banda, els grups hidrofílics de les bases (NH, NH<sub>2</sub> i CO) interaccionen bé amb dissolvents que formen ponts d'hidrogen. La suma de les contribucions dels plans hidrofòbics, les parts hidrofíliques i les interaccions iòniques provoquen que els àcids nucleics assoleixin una estructura helicoïdal i, per tant, presentin un senyal

apreciable de dicroisme circular. En el cas d'àcids nucleics de cadena doble, aquest dicroisme circular és molt útil donat que el senyal mesurat depèn de la interacció entre ponts d'hidrogen, de forma que s'obté un senyal sensible a la distància entre les dues cadenes, a la inclinació i a la distància de les bases respecte a l'eix de l'hèlix. Aquesta dependència permet dur a terme experiments on es poden observar grans variacions en la forma i en la intensitat del senyal mesurat en variar les condicions experimentals. Per exemple, variacions de temperatura que provoquen el trencament dels enllaços d'hidrogen o modificacions en les condicions salines que apantallen les repulsions electrostàtiques [1]. Així, és lògic establir que, quan els àcids nucleics es troben en unes condicions que permeten conformacions ordenades, el senyal de dicroisme circular serà major que en els casos que es trobin desordenades (Figura 3.7.).



**Figura 3.7.** Espectre de DC de l'ADN de *E. Coli* en la seva forma nativa a 20°C (línia contínua), desnaturalitzat a 60°C (línia discontinua) i mitjana dels espectres de CD dels quatre nucleòtids habituals (línia de punts) [13].

Usualment s'enregistra tot l'espectre de dicroisme circular per tal d'obtenir informació estructural a partir de la posició on apareixen les bandes. Així, a la bibliografia es troben caracteritzats un gran nombre d'estructures d'àcids nucleics. Per exemple, el B-ADN, que presenta dues bandes positives a 275 i 220 nm i una banda negativa a 245 nm [1].



**Figura 3.8.** Espectres de dicroisme circular de les estructures A-ADN, B-ADN i Z-ADN [1].

La Figura 3.8. mostra els espectres de dicroisme circular de les tres estructures més típiques dels àcids nucleics: les formes A-ADN, B-ADN i Z-ADN. Com es pot observar, les conformacions helicoidals dextrògires (A-ADN i B-ADN) presenten longituds d'ona de màxims i mínims semblants malgrat que no siguin idèntics. En canvi, la conformació levògira (Z-ADN) presenta un espectre de dicroisme totalment diferent dels anteriors.

Malgrat la possibilitat d'enregistrar tot l'espectre, l'estudi de les transicions conformacionals s'ha dut a terme tradicionalment mesurant el senyal a una única longitud d'ona com en el cas de

l'absorció molecular a l'UV [14]. En el cas del dicroisme circular però, aquesta longitud d'ona no és única com en el cas de l'absorció molecular sinó que dependrà de l'estructura d'àcid nucleic amb la qual s'estigui treballant.

*Instrumentació*

En aquesta tesi s'han fet servir dos instruments de dicroisme circular que es troben localitzats als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

En els primer treballs es va fer servir l'espectropolarímetre Jasco J-720 equipat amb un sistema de control de la temperatura per bany d'aigua Neslab RET-110.



**Figura 3.9.** Espectropolarímetre Jasco J-720.



Darrerament, s'ha utilitzat l'espectropolarímetre Jasco J-810 equipat amb dos sistemes de control de la temperatura: un bany d'aigua (JULABO F-25/HD) i un *peltier* (PFD-452S).



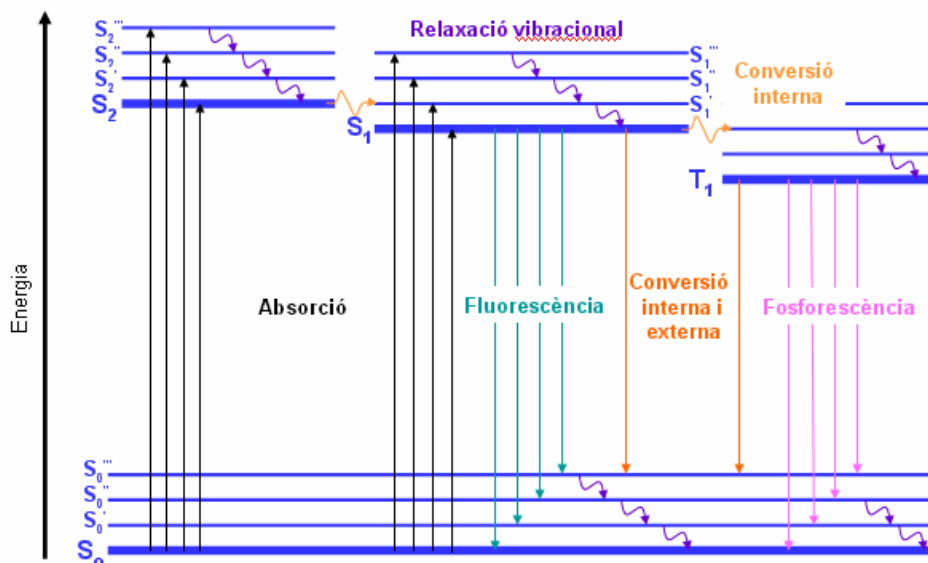
**Figura 3.10.** Espectropolarímetre Jasco J-810.

## **Fluorescència molecular**

### *Fonaments teòrics*

Quan s'irradia una molècula la radiació incident pot ser absorbida i, a més del fenomen d'absorció molecular descrit anteriorment, es poden produir altres efectes que permeten extreure informació d'aquesta molècula. Així, l'energia de la radiació incident provocarà l'aparició de diversos estats excitats transitoris que perdran aquesta energia per diferents vies, com la relaxació vibracional per pèrdua de calor, les reaccions fotoquímiques o per l'emissió de la radiació en forma de fluorescència o fosforescència [6]. A continuació es farà una breu descripció del fenomen de la fluorescència.

La fluorescència és el resultat d'un procés constituït per tres etapes que es produeixen a determinades molècules (generalment hidrocarburs poliaromàtics o heterocícles) anomenats fluoròfors. El procés responsable de la fluorescència s'il·lustra en el diagrama de Jablonski (Figura 3.11.), on es mostren els diferents nivells d'energia en un sistema fotoluminiscent [15].



**Figura 3.11.** Diagrama parcial d'energia per a un sistema fotoluminiscent on es mostren els processos d'absorció, fluorescència i fosforescència.

En primer lloc, es produeix l'excitació del fluoròfor causada per l'absorció d'un fotó d'energia ( $h \cdot \nu_{excitació}$ ). Aquest és absorbit pel fluoròfor creant un estat electrònic singlet excitat ( $S_1'$ ). Aquest estat excitat existeix per un temps finit (típicament de 1 a 10 nanosegons). Durant aquest temps, el fluoròfor pot experimentar transicions conformacionals o interaccions amb molècules del medi. Aquests processos tenen dues conseqüències principals. Primer, l'energia de  $S_1'$  és parcialment dissipada donant lloc a un estat singlet excitat relaxat ( $S_1$ ) des del qual s'origina la fluorescència. Segon, no totes les molècules excitades inicialment retornen a l'estat fonamental ( $S_0$ ) per emissió de fluorescència ja que hi ha altres processos que poden despoblar l'estat  $S_1$  com la desactivació per col·lisions, la fluorescència per transferència de l'energia ressonant (FRET) o el creuament entre sistemes (que pot donar lloc a la fosforescència).

En el cas que es produeixi la fluorescència, un fotó d'energia ( $h \cdot \nu_{emissió}$ ) és emès, retornant el fluoròfor a l'estat fonamental ( $S_0$ ). Degut a l'energia dissipada durant el temps de vida de l'estat excitat, l'energia d'aquest fotó serà menor i, per tant, serà emès a una longitud d'ona més gran que la d'excitació. Aquests diferents processos donen lloc al coeficient conegut com a rendiment quàntic, el qual relaciona el nombre

de fotons emesos per fluorescència amb el nombre de fotons absorbits. Aquest coeficient mesura l'extensió relativa del procés estudiat. La intensitat de la radiació fluorescent detectada,  $I_f$ , és directament proporcional a la concentració de fluoròfor present en la solució:

$$I_f = k \cdot c \quad \text{Equació 3.14.}$$

on  $k$  és una constant on estan inclosos termes relatius a la potència del raig incident i al rendiment quàntic. Aquesta expressió és anàloga a la llei de Lambert-Beer i, per tant, els mètodes quimiomètrics emprats en aquesta Tesi es podran aplicar a aquest tipus de dades. Diferents factors poden afectar tant la intensitat de fluorescència com la posició on apareixen les bandes d'emissió. Alguns d'aquests factors són la temperatura, el dissolvent utilitzat, l'oxigen dissolt en la solució i el pH [6].

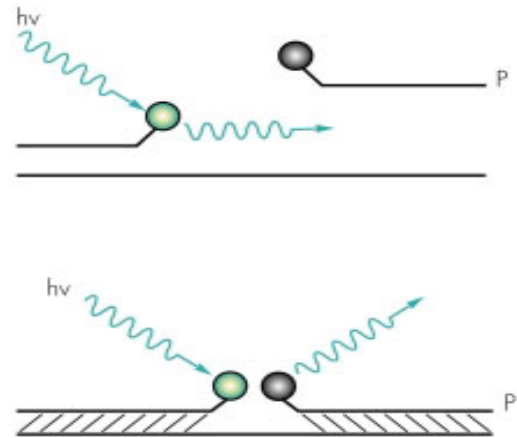
#### *Aplicació de la fluorescència molecular a l'estudi dels àcids nucleics*

Els cinc nucleòtids constituents habituals dels àcids nucleics presenten una intensitat de fluorescència baixa a temperatura ambient i en solució aquosa. El rendiment quàntic varia des de  $0,3 \cdot 10^{-4}$  a  $1,2 \cdot 10^{-4}$ , i els temps de fluorescència són de l'ordre de piconsegons [1]. Aquests baixos rendiments quàntics provoquen que aquestes mesures siguin poc utilitzades degut al gran efecte que podrien tenir impureses fluorescentes. Això es pot estendre cap als oligonucleòtids i als polinucleòtids que s'estudien en aquesta Tesi Doctoral.

Per utilitzar la fluorescència en l'estudi de les transicions conformacionals d'oligonucleòtids cal fer servir estratègies diferents per tal d'incrementar la intensitat de la fluorescència obtinguda:

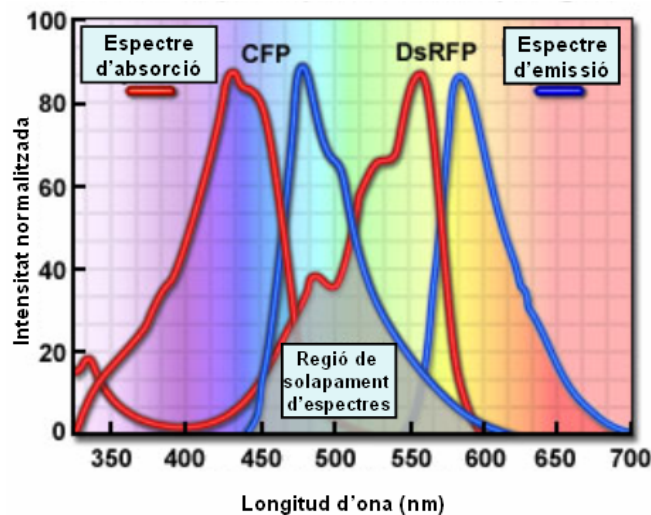
- Utilització de bases modificades fluorescentes. La síntesi de cadenes d'oligonucleòtids que presenten una o varies bases nitrogenades modificades permet obtenir intensitats majors de fluorescència [16]. Un exemple d'aquestes bases modificades fluorescentes és la 2-aminopurina [17].

- Fluorescència per transferència d'energia ressonant (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). A part de ser emesa com radiació fluorescent o patir una desactivació no radiativa, l'energia del singlet excitat pot ser transferida d'un fluoròfor a un altre (Figura 3.12.) [18]. Aquesta transferència es pot produir per l'emissió d'una molècula i l'absorció d'una altra o, de forma més general, per la transferència d'energia ressonant proposada per



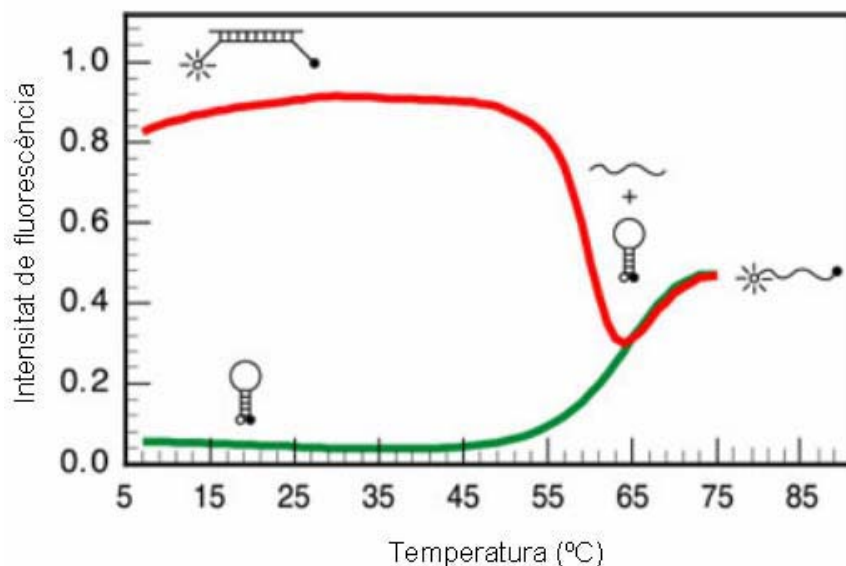
**Figura 3.12.** Esquema del procés de fluorescència per transferència d'energia ressonant. a) donador i acceptor separats; b) donador i acceptor junts.

Förster [19]. Aquesta transferència implica una interacció dipol-dipol en la qual la molècula donadora excitada transfereix la seva energia a l'acceptor. Aquest fenomen només apareix quan el donador i l'acceptor estan a distàncies molt curtes (menor de  $100 \text{ \AA}$ ) i l'espectre d'absorció de l'acceptor s'ha de superposar amb l'espectre d'emissió del donador (Figura 3.13.). Així, per tal de poder observar aquest fenomen, l'oligonucleòtid haurà de contenir dos fluoròfors que compleixin les condicions anteriors.



**Figura 3.13.** Regió d'encavalcament espectral a partir dels espectres d'absorció de dues variants cian (CFP) i vermella (DsRFP) d'una proteïna [20].

- Alimares moleculars. En els últims anys, i amb uns fonaments teòrics molt similars al de la tècnica FRET, han aparegut el que es coneixen com a alimares moleculars (*molecular beacons*). En aquest cas, la cadena ha de tenir dues modificacions, un fluoròfor i un *quencher* o amortidor de fluorescència. El nom d'alimara molecular es proposa al treball original de Tyagi i Kramer degut a que únicament emeten un senyal fluorescent quan es troben hibridats a les molècules objectiu mentre que la resta del temps no emeten radiació fluorescent [21]. En el treball de Tyagi i Kramer es van fer servir oligonucleòtids amb forma de forqueta en els quals a l'extrem 5' de la cadena hi ha un fluoròfor (EDANS) i a l'extrem 3' de la cadena hi ha un amortidor (DABCYL). Així, quan l'oligonucleòtid es troba en una estructura ordenada, el fluoròfor i el amortidor es troben a una distància petita (estructura en forma de forqueta) de forma que no s'observa fluorescència. En canvi, quan es troba en una estructura desplegada, aquesta distància augmenta (la forqueta s'obre) i, per tant, s'observa la radiació fluorescent.



**Figura 3.14.** Representacions de corbes de desnaturalització tèrmica obtingudes mitjançant la tecnologia de les alimares moleculars [22].

La Figura 3.14. mostra dues possibles formes d'aplicació de la tecnologia de les alimares moleculars. La corba de desnaturalització tèrmica de color verd serveix com a exemple del treball original de Tyagi i Kramer [21] descrit abans. D'altra banda, la corba de desnaturalització de color vermell representa un cas més complex. Així, inicialment es té una estructura dúplex en la qual el fluoròfor

i l'amortidor es troben separats i, per tant, es detecta una senyal de fluorescència important. A temperatures més elevades l'estructura dúplex es desnaturalitza i la cadena amb el fluoròfor i l'amortidor en els extrems adopta una estructura de forqueta la qual cosa implica una disminució de la intensitat de fluorescència. A temperatures més elevades es produeix un augment de la intensitat de fluorescència per la desnaturalització de l'estructura de forqueta i la consegüent separació del fluoròfor i l'amortidor.

### *Instrumentació*

En aquest treball s'ha utilitzat l'espectrofluorímetre Aminco-Bowman Sèrie 2 equipat amb una cel·la termostatitzada mitjançant un bany d'aigua (SELECTA).



**Figura 3.15.** Espectrofluorímetre Aminco-Bowman Sèrie 2.

Aquest instrument es troba al Laboratori del grup de Quimiometria del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

## **Ressonància Magnètica Nuclear**

### *Fonaments teòrics*

Les bases de l'espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN) van ser proposades per W. Pauli el 1924 [23] quan va suggerir que determinats nuclis atòmics

podrien tenir spin i moment magnètic. El 1946 Bloch [24] i Purcell [25] van demostrar experimentalment aquesta hipòtesi. A partir d'aquí va començar l'expansió d'aquesta tècnica fins convertir-se actualment en una de les tècniques espectroscòpiques més utilitzada en química i en altres camps, com per exemple, la medicina [26].

La RMN es basa en la mesura de l'absorció de la radiació electromagnètica en la regió de radiofreqüències de 4 a 600 MHz. En contrast amb l'absorció a l'ultraviolat, visible o infraroig, en el procés d'absorció es troben implicats els nuclis dels àtoms i és necessari col·locar les mostres en un camp magnètic intens [6]. No tots els nuclis atòmics poden ser determinats mitjançant la tècnica RMN. Només els nuclis que tenen un spin diferent de zero podran ésser detectats ja que en ells és possible el desdoblament dels nivells d'energia nuclear de spin. Exemples de nuclis detectats són  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ . Els protons ( $^1\text{H}$ ) són els nuclis més fàcilment detectables degut a la seva gran abundància (99,98%) sobre el total de l'hidrogen natural. La resta de nuclis detectables presenta abundàncies naturals més baixes (excepte el  $^{31}\text{P}$ ), el que provoca que siguin més difícils de detectar, limitant la seva utilització. L'aparició de mètodes d'enriquiment o de marcació isotòpica estan augmentant les seves possibilitats d'aplicació.

Els espectres de RMN representen les freqüències a les quals es produeixen les transicions entre els estats de spin (per exemple, en el cas de RMN de protó són  $+\frac{1}{2}$  i  $-\frac{1}{2}$ ). Tots els spins d'un determinat tipus tindran freqüències de ressonància similars a un determinat camp magnètic, però nuclis del mateix tipus en entorns químics diferents mostraran diferències en la freqüència de la transició. Aquestes diferències són conegudes com desplaçaments químics, els quals apareixen per les distorsions causades pels electrons presents al voltant dels nuclis i depenen linealment del camp aplicat. Per tant, es fa necessària la utilització de patrons que permetin mesurar el desplaçament químic relatiu respecte als nuclis dels patrons com, per exemple, el (trimetilsilil)propionat (TSP) [6].

Els spins dels nuclis són també sensibles a la presència de moments magnètics causats per altres spins nuclears del seu entorn. Aquest acoblament entre spins d'àtoms diferents es transmet a través dels enllaços de qualsevol parella de spins nuclears pròxims però rarament es pot observar a distàncies grans. El desplaçament

de les freqüències causada per aquest efecte dependrà dels spins dels dos nuclis i d'una constant ( $J$ ) que indica l'efectivitat de la transmissió de l'acoblament de forma que, a menor distància (menor nombre d'enllaços entre els nuclis), major serà el valor de la constant. A partir d'aquí es pot establir que, per a cada nucli, la freqüència original de ressonància es descompondrà en dos estats diferents (un doblet) que estaran separats per un valor de freqüència igual a  $J_{ij}$ , tal i com es mostra a la Figura 3.16. Si hi ha més d'un spin al voltant del nucli es dividirà la ressonància en més components de forma que el nombre de nuclis veïns pot ser determinat pel nombre de senyals observades (per exemple, observar un quadruplet indicarà la presència de tres nuclis).



**Figura 3.16.** Exemple de desdoblatment del senyal en presència de dos spins.

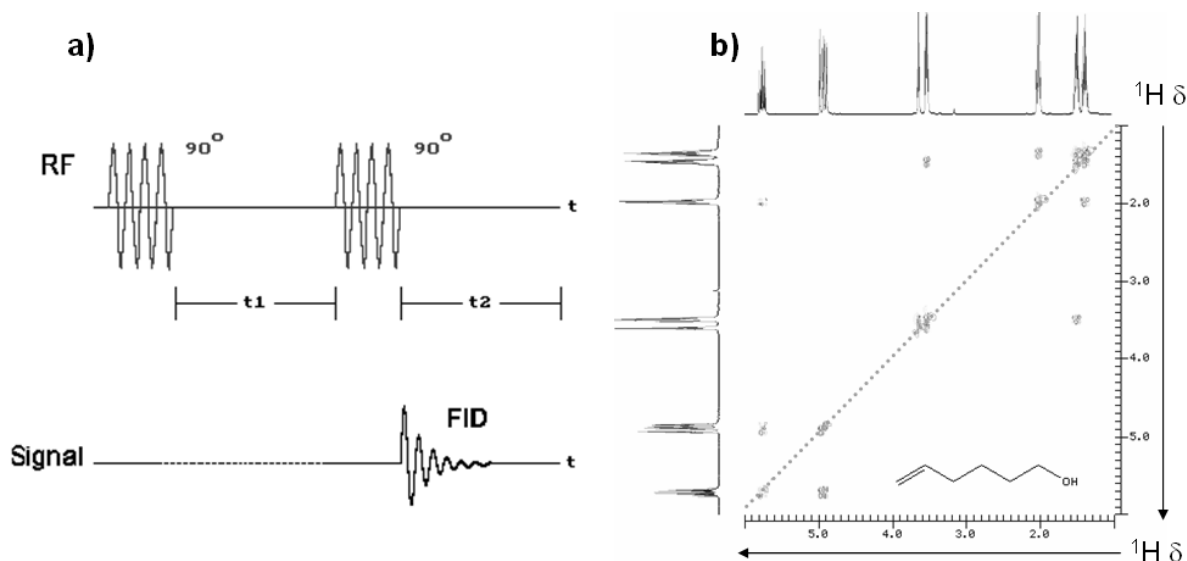
Els espectròmetres de RMN operen actualment aplicant pulsacions en el mode de transformada de Fourier. Així, als nuclis que estan sota un intens camp magnètic se'ls aplica periòdicament pulsacions curtes a una freqüència molt pròxima a la natural de precessió del spin nuclear. Aquestes pulsacions desplacen el moment magnètic dels nuclis dels seus estats originals i, en el temps entre pulsació i pulsació, els nuclis retornen als seus estats original emetent un senyal de radiofreqüència en el domini de temps, que s'anomena senyal de caiguda lliure d'inducció (*Free Induction Decay*, FID) [6]. Per analitzar aquests espectres, es realitza la transformada de Fourier del senyal obtingut de forma que s'obté un espectre que relaciona la freqüència i l'amplitud del senyal obtingut (Figura 3.17.). L'obtenció de l'espectre per transformada de Fourier és molt més ràpid que el mètode original d'obtenció dels espectres de RMN d'ona contínua i permet l'acumulació de gran quantitat d'espectres en un espai de temps curt, de forma que permet augmentar la sensibilitat de la tècnica en fer la mitjana de tots els espectres.





**Figura 3.17.** Efecte de la transformada de Fourier. A l'esquerra es mostra el senyal FID on es té una representació del moment magnètic ( $M_v$ ) en el domini de temps. A la dreta es mostra el resultat de la transformada de Fourier d'aquest FID en el qual es té l'amplitud del senyal en el domini de freqüències.

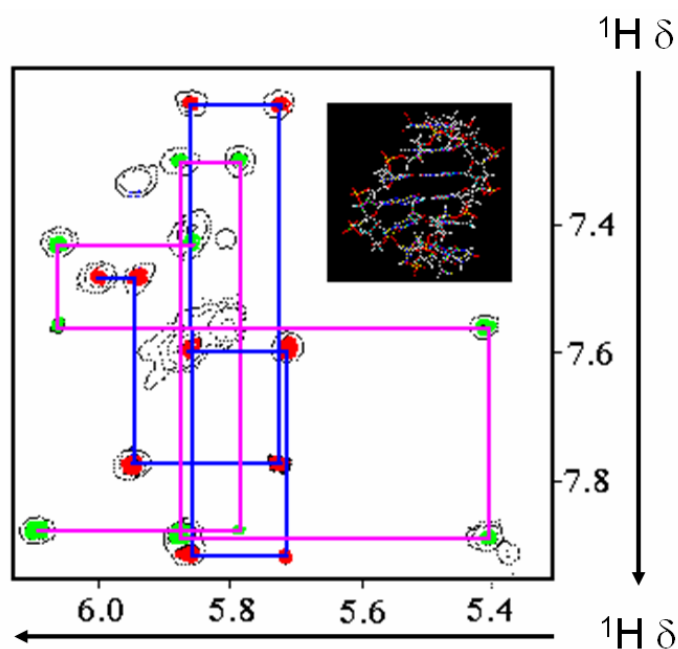
L'obtenció d'espectres multidimensionals (RMN multidimensional) es realitza de manera similar a l'explicada anteriorment, amb pulsacions curtes i l'aplicació de la transformada de Fourier [27]. A diferència de la RMN monodimensional es fan servir seqüències amb múltiples pulsacions i aturades (tal com es pot observar a la Figura 3.18. per a un experiment de tipus de correlació espectroscòpica homonuclear, COSY). El nombre d'experiments bidimensionals diferents possible és molt gran, però tots tenen en comú els períodes de preparació, evolució, mescla i detecció. En tots aquests casos, s'apliquen dues transformades de Fourier (una a les columnes i una altra a les files de la matriu de dues dimensions) per tal d'obtenir l'espectre d'amplitud enfront de les dues freqüències.



**Figura 3.18.** Exemple d'experiment COSY. a) A la part superior es mostra la seqüència de pulsos i temps de relaxament. A la part inferior es mostra el senyal FID enregistrat. b) Espectre COSY del 5-hexen-1-ol en el qual es mostren als eixos x i y els espectres  $^1\text{H}$ -RMN. L'espectre COSY es llegeix a la diagonal del diagrama de contorn a partir del qual es pot extreure informació sobre l'acoblament entre els nuclis detectats.

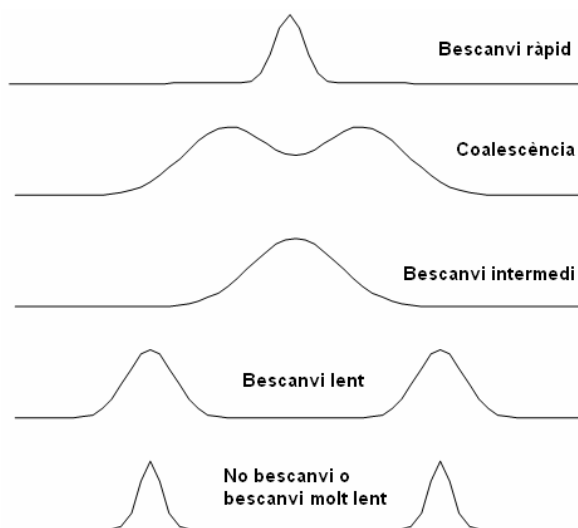
*Aplicació de la Ressonància Magnètica Nuclear a l'estudi dels àcids nucleics*

La RMN és una de les poques tècniques espectroscòpiques que permet extreure directament informació estructural. Així, a partir dels valors de desplaçament químic, constants d'acoblament i temps de relaxació es poden determinar les distàncies i els angles entre els àtoms i deduir un model d'estructura que satisfaci els resultats experimentals com, per exemple, el que es mostra a la Figura 3.19. [28].



**Figura 3.19.** Part d'un espectre 2D NOESY (Espectroscòpia basada en l'Efecte Nuclear Overhauser de  $^1\text{H}$ ) de l'oligonucleòtid de tipus forqueta CGCGTTTTTCGCG on a partir d'assignacions de protons i restriccions d'enllaços es pot arribar a proposar un model per a l'estructura de l'oligonucleòtid.

La RMN és una tècnica espectroscòpica sensible als canvis de concentració de les espècies durant un procés químic determinat. Malgrat això, quan més d'una espècie és present en el procés, la separació dels senyals RMN corresponents a cada espècie únicament serà possible si la separació dels seus desplaçaments químics (com a freqüències) és suficientment gran respecte a la constant d'interconversió. A mesura que aquesta diferència es fa més petita, els pics detectats es fan més amples fins arribar al punt de col·lapsar en un únic pic (coalescència) com es pot veure a la Figura 3.20. [27]



**Figura 3.20.** Diferents possibilitats de la relació entre la constant d'interconversió i els desplaçaments químics de dos senyals.

#### *Aplicació de mètodes quimiomètrics a l'anàlisi de dades de RMN*

En aquesta Tesi Doctoral s'han analitzat dades de RMN corresponents al seguiment de processos on intervenen àcids nucleics.

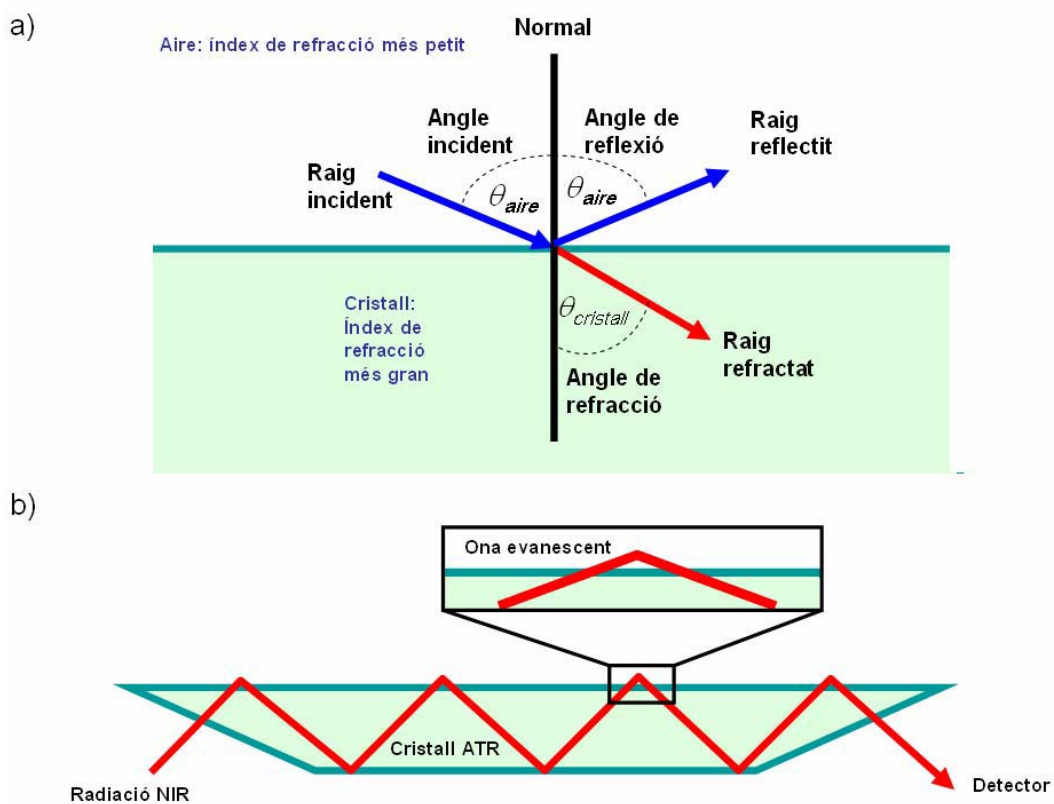
En un primer treball, es va estudiar la possibilitat de seguir processos mitjançant  $^1\text{H}$ -RMN on els espectres adquirits presenten el problema de la coalescència dels senyals que s'ha descrit anteriorment. Així, la velocitat de la reacció és suficientment gran comparada amb la freqüència a la qual absorbeixen la radiació els nuclis de la mostra que es vol estudiar i, per tant, els senyals RMN corresponents a cada espècie no es poden diferenciar i apareix un únic senyal de RMN. En particular, els espectres estudiats en aquest treball corresponen a la valoració àcid-base de dos desoxinucleòtids que van ser adquirits utilitzant un espectròmetre Varian a 200 MHz.

En un segon treball, es va estudiar la reacció entre el cisplatí i un oligopèptid que presenta una cinètica lenta, per la qual cosa no hi ha l'inconvenient de l'ambigüïtat estudiada en el treball anterior. Les dades analitzades consistien en una sèrie d'espectres bidimensionals del tipus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC RMN (on HSQC significa Coherència Quàntica Simple Heteronuclear) enregistrats a diferents temps mitjançant en un espectròmetre Varian a 500 MHz [29] que van ser proporcionades pel Grup d'Àcids Nucleics del Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona.

### Reflexió Total Atenuada a l'Infraroig proper per transformada de Fourier

#### Fonaments teòrics

El principi de la reflectància total atenuada (ATR) es basa en el fenomen de la reflexió total interna i la transmissió de la llum a través d'un cristall amb un elevat índex de refracció (Figura 3.21.) [6].



**Figura 3.21.** a) Representació esquemàtica del fenomen de la refracció de la llum. b) Reflectància total interna i ona evanescent.

Quan la llum incideix en el cristall amb un angle incident,  $\theta_{aire}$ , allunyat de la normal és parcialment reflectida i segueix un camí amb el mateix angle  $\theta_{aire}$  però en el costat oposat a la perpendicular de la superfície. La llum que entra en el cristall a través de la interfície canvia la seva direcció, és a dir, es desvia o refracta un determinat angle de refracció  $\theta_{cristall}$ . Així, la refracció provoca que la llum que es desplaça fora del cristall

sigui parcialment reflectida i parcialment refractada [30]. Aquests angles es poden relacionar per la llei de Snell:

$$n_{r,\text{aire}} \sin \theta_{\text{aire}} = n_{r,\text{cristall}} \sin \theta_{\text{cristall}} \quad \text{Equació 3.15.}$$

A partir d'un cert angle crític ( $\theta_{\text{crític}}$ , que relaciona  $\theta_{\text{cristall}}$  i  $\theta_{\text{aire}}$ ), la llum ja no pot sortir del cristall i es produeix la reflexió total interna. És aquesta reflexió total interna la que permet a la llum ésser tramesa a través d'una fibra de sílice (fibra òptica). L'índex de refracció del nucli de la fibra és més gran que el del material que el recobreix. Cal tenir en compte que no tota la llum que entra pel final de la fibra es propaga al llarg d'aquesta, sinó que depèn de l'angle amb que entra. També s'ha de tenir present que la llum que es reflecteix internament penetra a la superfície uns micròmetres, el que es coneix com ona evanescent [6].

L'ona evanescent que arriba a l'exterior de la superfície on es produeix la reflexió total interna interacciona amb el material del costat exterior de la superfície. Si el costat extern de la superfície absorbeix llum a la longitud d'ona a la qual s'està propagant, la llum que viatja internament a través del material es troba atenuada, i es pot registrar l'espectre del material inferior. Aquest tipus de presa de mostra és molt efectiu per sòlids i líquids, especialment en les regions de l'infraroig mitjà i proper. D'aquesta forma, la llum incident xoca amb la superfície de la mostra amb l'angle escollit que és el mateix que l'angle que es talla al final del cristall. El feix de llum es situa de forma que el raig incident quedi perpendicularment al cristall (una geometria que minimitza la llum reflectida), de forma que la llum es propaga per reflexió total interna. L'angle de la llum incident i la geometria del cristall faciliten que es produeixin successives reflexions a les seves cares internes.

Els mètodes ATR s'han adaptat per a la seva utilització amb fibra òptica. Així, es col·loca un mirall al final de la fibra per reflectir la llum i s'elimina el recobriment de l'extrem per a alguna longitud d'ona determinada. La superfície lliure de recobriment es pot revestir amb una petita capa ( $\mu\text{m}$ ) d'un polímer porós solvatat que contingui un reactiu colorejat, o bé es pot enllaçar covalentment el reactiu a la superfície. Això permetrà la realització de mesures quantitatives, ja que tant la geometria com els índexs de refracció són constants [6]. Aquestes sondes de fibra òptica es fan servir freqüentment pel seguiment de processos en continu (*on-line*).

### *Aplicació de mètodes quimiomètrics a l'anàlisi de dades NIR de mostres de benzines*

Els mètodes ATR d'espectroscòpia NIR s'han utilitzat en aquesta Tesi Doctoral per seguir el procés de mescla o *blending* de diferents tipus de benzines.

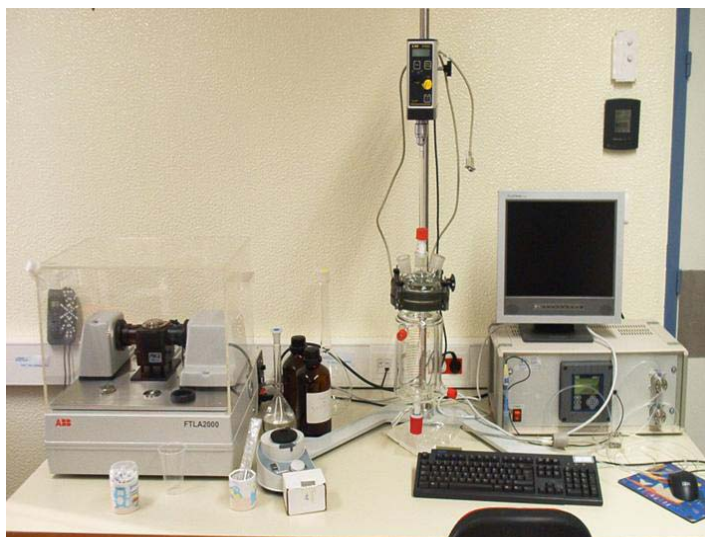
El seguiment dels processos de mescla de diferents tipus de benzines és duu a terme habitualment mitjançant l'anàlisi de mostres *off-line*. Aquest tipus d'anàlisi comporta temps llargs (extracció, transport i anàlisi de la mostra al laboratori) en el que les condicions del sistema que es vol caracteritzar poden canviar. Actualment, els mètodes *on-line* comencen a ser majoritàriament utilitzats en l'àmbit industrial. En aquests mètodes *on-line* s'utilitzen sondes de fibra òptica amb les quals s'obté informació sobre el sistema a temps real de forma que qualsevol incidència pot ser detectada abans.

L'espectroscòpia NIR presenta grans avantatges, com la de no ser destructiva, no contaminar la mostra i, al mateix temps, ser suficientment ràpida per tal de dur a terme el seguiment dinàmic de processos (com per exemple, el processos de mescla de benzines). A la bibliografia existeix un gran nombre de treballs amb aplicacions de mètodes quimiomètrics a l'anàlisi de benzines mitjançant espectroscòpia NIR i es pot considerar que una de les indústries on més àmpliament s'utilitzen els mètodes quimiomètrics és la petrolífera [31-33]. En aquests treballs s'han utilitzat una gran varietat de mètodes quimiomètrics com el calibratge amb PLS [34, 35] o PCR [31], o com l'exploració de mostres mitjançant mètodes de classificació [36]. Així, a partir de l'anàlisi quimiomètric d'espectres NIR es pot aconseguir tant la determinació quantitativa de paràmetres característics de les benzines (per exemple, el seu nombre d'octà o el seu contingut en hidrocarburs aromàtics) com la classificació de tipus diferents de benzines [37-39].

### *Instrumentació*

El sistema utilitzat per simular els processos de mescla a escala de laboratori va ser el BACH (*Bench-scale system for Advanced Chemometrics Studies*) que esta format per una sonda de transmitància NIR (Solvias AG) connectada a un instrument de NIR per transformada de Fourier (ABB-BOMEM), un sistema de bombes, un reactor, un

agitador magnètic i un ordinador de control. Aquest muntatge es pot veure a la Figura 3.22.



**Figura 3.22.** Muntatge experimental del sistema BACH on s'observa d'esquerra a dreta l'instrument FT-NIR, la sonda de transmitància NIR, el reactor, el sistema de bombes i el ordinador de control.

Aquest instrument es troba al *BioSystems and Engineering Laboratory* del *Instituto Superior Técnico de Lisboa* dirigit pel professor José C. Menezes i va ser utilitzat al llarg d'una estada d'investigació de tres mesos.

### **Electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE)**

#### *Fonaments teòrics*

L'electroforesi en gel és una tècnica en la qual s'utilitza un corrent elèctric controlat per separar els components d'una barreja segons el seu tamany i càrrega elèctrica a través d'una matriu gelatinosa [40]. Aquesta tècnica va ser utilitzada per primer cop l'any 1937, però la seva importància no es va incrementar fins als anys 50 quan E.L. Durrum i Arne W.K. Tiselius van impulsar el mètode de l'electroforesi de zona, nom que es va assignar a la separació de materials en un camp elèctric en presència d'algun tipus de suport. Malgrat que inicialment aquest terme es va limitar a l'anàlisi de col·loides i partícules submicroscòpiques, s'ha convertit en els darrers anys en una metodologia aplicada a qualsevol substància de baix pes molecular.

Quan una mescla de molècules ionitzades i amb càrrega neta és col·locada en un camp elèctric, les molècules experimenten una força d'atracció cap al pol que té càrrega oposada. Si es deixa passar un cert temps, les molècules carregades positivament es desplaçaran cap al càtode (pol negatiu) i les carregades negativament es desplaçaran cap a l'ànode (pol positiu). En els mètodes electroforètics s'apliquen petites quantitats de la dissolució problema a un suport sòlid (que acostumen a ser en forma de gels) impregnat amb una solució tampó. Els gels utilitzats com a suport poden ser de paper (cel·lulosa), midó, poliacrilamida, agarosa o acetat de cel·lulosa, entre altres. El principal avantatge d'aquest mètode és que presenta un gran poder de resolució ja que s'aplica una petita quantitat d'anàlit a una zona estreta i la longitud del trajecte es molt més gran que la zona d'aplicació.

#### *Aplicacio de l'electroforesi en gel als àcids nucleics*

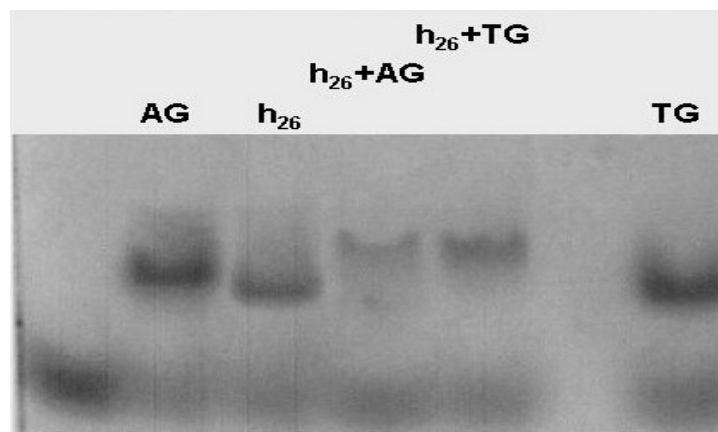
Els àcids nucleics són molècules carregades negativament degut a la presència de grups fosfat a la seva estructura. L'enllaç fosfodièster de les cadenes de polinucleòtids condiciona la càrrega d'un àcid nucleic que és aproximadament igual al nombre de grups fosfat [40, 41]. A més, s'ha de tenir en compte que el moviment de les molècules d'àcid nucleic en un camp elèctric dependrà, també, del seu pes molecular i de la seva estructura tridimensional.

Les molècules d'àcid nucleics acostumen a tenir pesos moleculars relativament grans i, per tant, la seva capacitat per penetrar algunes preparacions de gels és limitada. Això provoca que les seqüències d'àcids nucleic amb menys de 500 parells de bases es puguin separar amb gels de poliacrilamida però per a seqüències més grans s'han d'utilitzar gels més porosos com els d'agarosa. Per tal de controlar la migració de les molècules d'ADN es fan servir colorants de localització que ens permeten determinar aproximadament on es troben les molècules d'ADN durant el procés electroforètic com, per exemple, el blau de bromofenol i el xilen-cianol.

En els cas dels ADN, per tal de visualitzar les taques als gels es poden fer servir els mètodes de revelatge amb radiació ultraviolada o de la tinció mitjançant colorants com a la Figura 3.23. En aquest darrer cas, poden ser emprats diferents colorants malgrat que generalment s'utilitzen el bromur d'etidi o el "stains all" que proporciona una



coloració diferent depenent de la natura de la molècula (ARNs, ADNs i proteïnes) i, en alguns casos, la seva estructura [41].



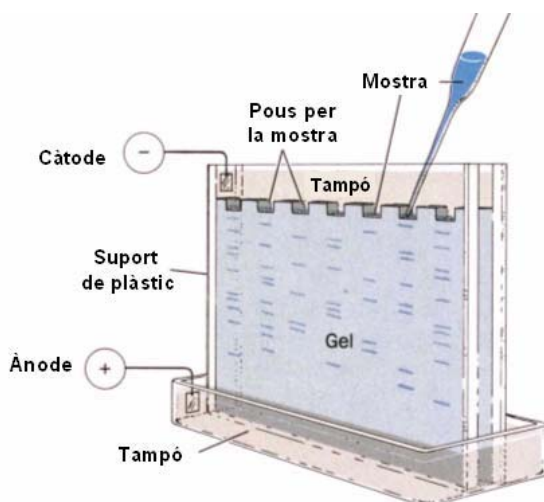
**Figura 3.23.** Exemple d'un gel de poliacrilamida colorejat amb el colorant *stains all* fet servir per determinar estructures triples . En el primer carril es troba el colorant Blau de Bromofenol. Als carrils 2-6 es troben diferents oligonucleòtids i barreges d'aquests (veure apartat 5.3.).

#### *Instrumentació i experimental*

L'equipament que es requereix es molt simple: font d'alimentació, cubeta vertical o horitzontal a l'interior de la qual es col·loca el suport i els dos elèctrodes com es pot veure a la Figura 3.24. El gel es troba en contacte amb el dos compartiments on es situen el càtode i l'ànode, els quals es troben plens de solució amortidora i entre dues plaques de vidre o plàstic. La part superior del gel presenta uns petits pous on s'introdueix la mostra problema juntament amb petites quantitats de glicerol i colorant de localització.

En aquesta Tesi Doctoral s'ha emprat l'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions no desnaturants pels àcids nucleics. Així, els gels es va dur a terme a una temperatura baixa (4°C) i sense la presència d'agents desnaturants. Els gels de poliacrilamida al 15% s'obtenen per la polimerització de la mescla acrilamida:bis-acrilamida (29:1) que també contenen una concentració 90 mM de tris-borat-EDTA (TBE). Les mostres d'àcids nucleics s'escalfen a 90 °C durant 5 minuts, es deixen refredar lentament i es dissolen en un tampó de TBE a una concentració de 90 mM amb un 5% de glicerol abans d'injectar-les al gel. El procés electroforètic es deixa en funcionament el temps necessari per tal de que la referència utilitzada de blau de

bromofenol migrés com a mínim la meitat de la longitud del gel. Posteriorment es procedeix a la visualització de les mostres per tinció amb el colorant “*stains-all*” a un 15% de formamida en aigua. Finalment, es procedeix al rentat del gel amb aigua destil·lada i a la destenyiment del fons del gel per exposició a radiació IR que permet l’eliminació del colorant que no hagi interaccionat amb DNA.



**Figura 3.24.** Esquema del material necessari per dur a terme una electroforesi en gel (adaptada de [42]).

Aquests experiments es van dur a terme al Grup de síntesi i propietats dels oligonucleòtids modificats dirigit pel Dr. Ramon Eritja de l’Institut de Biologia Molecular de Barcelona adscrit al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

### 3.3. Bibliografia

- (1) Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Jr., I. T. (1999) *Nucleic Acids. Structure, Properties and Functions*. ed. University Science Books, Sausalito, CA, USA.
- (2) Blackburn, M.; Gait, M. J. (1990) *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- (3) Mergny, J. L.; Lacroix, L. (2003) Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, **13**, 515-537.
- (4) Harman, T. C.; Cahn, J. H.; Logan, M. J. (1959) Measurement of Thermal Conductivity by Utilization of the Peltier Effect. *Journal of Applied Physics*, **30**, 1351-1359.
- (5) Morris, W. E. (1988) Blending Gasoline. *Oil & Gas Journal*, **86**, 6-16.
- (6) Skoog, D. A.; Leary, J. J. (1994) *Análisis Instrumental*. 4rta Ed. ed. McGraw-Hill, Madrid.
- (7) Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. (2000) *Circular Dichroism: principles and applications*. 4rta. ed ed. Wiley-VCH, New York, NY, USA.
- (8) Fasman, G. D. (1996) *Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. 1era. ed. ed. Plenum Press, New York, NY, USA.
- (9) Saenger, W. (1988) *Principles of nucleic acid structure*. 2ona. ed. ed. Springer, New York, NY, USA.
- (10) Biot, J. B. *et Al.* (1812) Memoires de la Classe des Sciences Mathematiques et Physiques de l'Institut Imperial de France. *Journal*, **1**, 1-372.
- (11) Fresnel, A. (1824) *Bull. Soc. Philomath. Paris*, 147-158.
- (12) Moffitt, W.; Moscowitz, A. (1959) Optical Activity in Absorbing Media. *Journal of Chemical Physics*, **30**, 648-660.
- (13) Sprecher, C. A.; Johnson, W. C. (1977) Circular-Dichroism of Nucleic-Acid Monomers. *Biopolymers*, **16**, 2243-2264.
- (14) Marky, L. A.; Breslauer, K. J. (1987) Calculating Thermodynamic Data for Transitions of Any Molecularity from Equilibrium Melting Curves. *Biopolymers*, **26**, 1601-1620.
- (15) Jablosnki, A. (1935) Uber den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift fur Physik*, **94**, 38-46.
- (16) Verma, S.; Eckstein, F. (1998) Modified oligonucleotides: Synthesis and strategy for users. *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 99-134.

- (17) Gargallo, R.; Vives, M.; Tauler, R.; Eritja, R. (2001) Protonation studies and multivariate curve resolution on oligodeoxynucleotides carrying the mutagenic base 2-aminopurine. *Biophysical Journal*, **81**, 2886-2896.
- (18) Stryer, L. (1978) Fluorescence Energy-Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annual Review of Biochemistry*, **47**, 819-846.
- (19) Förster, T. (1949) Experimentelle und theoretische Untersuchung. des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungs-. energie. *Z. Naturforsch*, **4a**, 321.
- (20) <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html>.
- (21) Tyagi, S.; Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, **14**, 303-308.
- (22) <http://www.molecular-beacons.org/>.
- (23) Pauli, W. (1924) The theoretical significance of the satellites of some spectrum lines and the effect on them of magnetic fields. *Naturwissenschaften*, **12**, 741-743.
- (24) Bloch, F. (1946) Nuclear induction. *Physical Review*, **70**, 460-474.
- (25) Torrey, H. C.; Pound, R. V.; Purcell, E. M. (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.*, **69**, 37-38.
- (26) Kealey, D. (1989) *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Chemical Analysis*. 1era. ed. ed. John Wiley and Sons Ltd, New York, NY, USA.
- (27) Friebolin, H. (1991) *Basic One- and Two- Dimensional NMR spectroscopy*. 1era. ed. ed. VCH, Weinheim, Alemanya.
- (28) Evans, J. N. S. (1995) *Biomolecular Nmr Spectroscopy*. 1era. ed. ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
- (29) Marchan, V.; Moreno, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. (2001) Towards a better understanding of the cisplatin mode of action. *Chemistry-a European Journal*, **7**, 808-815.
- (30) Tipler, P. A. (1994) *Física*. 1era. ed ed. Reverté, Barcelona, Espanya.
- (31) Macho, S.; Larrechi, M. S. (2002) Near-infrared spectroscopy and multivariate calibration for the quantitative determination of certain properties in the petrochemical industry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **21**, 799-806.
- (32) Lavine, B.; Workman, J. J. (2004) Chemometrics. *Analytical Chemistry*, **76**, 3365-3371.
- (33) Lavine, B. K.; Workman, J. (2002) Chemometrics. *Analytical Chemistry*, **74**, 2763-2769.

- (34) Felicio, C. C.; Bras, L. P.; Lopes, J. A.; Cabrita, L.; Menezes, J. C. (2005) Comparison of PLS algorithms in gasoline and monitoring with MIR and NIR. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **78**, 74-80.
- (35) Chu, X. L.; Yuan, H. F.; Lu, W. Z. (2005) Effects of the accuracy of reference data on NIR prediction results. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **25**, 886-889.
- (36) de Oliveira, F. S.; Teixeira, S. G.; Araujo, M. C. U.; Korn, M. (2004) Screening analysis to detect adulterations in Brazilian gasoline samples using distillation curves. *Fuel*, **83**, 917-923.
- (37) Pavoni, B.; Rado, N.; Piazza, R.; Frignani, S. (2004) Ft-IR spectroscopy and chemometrics as a useful approach for determining chemical-physical properties of gasoline, by minimizing analytical times and sample handling. *Annali Di Chimica*, **94**, 521-532.
- (38) LitaniBarzilai, I.; Sela, I.; Bulatov, V.; Zilberman, I.; Schechter, I. (1997) On-line remote prediction of gasoline properties by combined optical methods. *Analytica Chimica Acta*, **339**, 193-199.
- (39) Wang, Z. M.; Hua, W. Y.; Wei, Z. K.; Zhang, H. H.; Wu, H. Z. (1999) Forecasting octane numbers of gasoline by NIR spectroscopy and the manufacture of octane number analyzer. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **19**, 684-686.
- (40) Mathews, C. K.; Holde, K. E. v.; Ahern, K. G. (2002) *Bioquímica*. 3era. ed. ed. Pearson Educación: Addison Wesley, Madrid, Espanya.
- (41) Martin, R. (1996) *Gel Electrophoresis: Nucleic Acids*. ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- (42) <http://www.science.fau.edu/chemistry/Mari/biochemlab/manual.html>.