2 ej 172

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IMPORTANCIA DEL TIOCIANATO DE AMONIO EN EVOLUCION QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

LUCIA PEREZGASGA CISCOMANI

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F. 1989

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Según la hipótesis de Oparin-Haldane, la vida se establece a través de un proceso evolutivo que puede dividirse en dos etapas: evolución química y evolución prebiológica.

La evolución química es un proceso postulado para explicar la formación abiótica de moléculas orgánicas de importancia biológica, que posteriormente originaron a las macromoléculas fundamentales de la vida. Estos mecanismos que fueron determinantes en los procesos evolutivos, son de naturaleza tanto física como química.

El tiocianato de amonio ha sido recientemente detectado en el material interestelar. Este hallazgo hace plausible tomar como hipótesis de partida la presencia de dicho compuesto en la Tierra Primigenia, y consecuentemente tratar de hallar sus productos de transformación bajo la acción de radiación gamma y fuentes térmicas, que son fuentes energéticas que se contemplan como mecanismos activadores en el proceso de evolución química.

Los resultados obtenidos muestran la formación de varios aminoácidos esenciales y de aminoácidos conteniendo azufre, tanto proteínicos como no proteínicos, por lo que este estudio constituye una posible vía de síntesis abiótica de aminoácidos azufrados, y de compuestos heterocíclicos.

INDICE

Página

CAPITULO I

INTRODUCCION 1

1.1. Esbozo histórico sobre el problema del origen de la vida 1

1.2. Algunos planteamientos generales de evolución química 4

1.2.1. Duración 4

1.2.2. Condiciones de la Tierra Primitiva 4

1.2.3. Fuentes primitivas de energía libre 6

1.3. Importancia del tiocianato en la evolución química y en sistemas biológicos actuales 9

1.3.1. Preparación de los tiocianatos y algunas de sus propiedades químicas 9

1.3.2. Presencia de los tiocianatos en los organismos contemporáneos 11

1.3.3. Importancia del tiocianato en la evolución química 13

1.3.4. Experimentos prebióticos con tiocianato 13

1.4. Objetivos 16

CAPITULO II

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES 17

2.1. Purificación de reactivos utilizados 17

2.1.1. Agua tridestilada 17

2.1.2. Solventes y reactivos químicos 17

2.2. Preparación del material de vidrio 17

2.3. Condensaciones térmicas con tiocianato de amonio 18

2.3.1. Síntesis de glicina según Kiages (1903), Ling y Nanji (1922) 18

2.3.2. Síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados 19

2.3.3. Estudios complementarios con algunos componentes de la mezcla de reacción 22

2.4. Irradiación de muestras. Experimento de radiólisis 23

2.4.1. Fuente de irradiación 23

2.4.2. Preparación de muestras para irradiación 24

2.4.3. Dosis de irradiación 24

2.4.4. Tratamiento de las muestras posterior a la irradiación 24

2.5. Técnicas analíticas generales 26

2.5.1. Hidrólisis 26

2.5.2. Electroforesis con alto voltaje en papel 27

2.5.3. Purificación de precipitados del experimento de síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados, por medio de una columna de intercambio iónico 28

2.5.4. Identificación y cuantificación de aminoácidos por cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) acoplada a un detector de U.V. 28

2.5.5. Cromatografía de gases 29

CAPITULO III

RESULTADOS 30

3.1. Experimentos por condensaciones térmicas y por radiaciones 30

3.1.1. Propiedades físicas de los precipitados 30

3.1.2. Espectros de infrarrojo 30

3.2. Formación de aminoácidos 33

3.2.1. Pruebas químicas cualitativas 33

3.2.2. Electroforesis con alto voltaje en papel 33

3.2.3. Purificación de precipitados en una columna de intercambio iónico 34

3.2.4. Identificación y cuantificación de aminoácidos por CLAP 35

3.2.5. Cromatografía de gases 38

CAPITULO IV

DISCUSION DE RESULTADOS 41

4.1. Formación de aminoácidos 41

4.2. Potencialidad del NH_4SCN en la síntesis de heterociclos 43

4.3. Otras reacciones probables en el sistema reactivo constituído por NH_4SCN, formaldehído, cloruro de amonio, ácido acético y agua 45

CAPITULO V

CONSIDERACIONES FINALES 47

APENDICE 49

REFERENCIAS 53

LISTA DE TABLAS

Página

TABLA I

Energía disponible para la síntesis de compuestos orgánicos 7

TABLA II

Fuentes de energía ionizante en la Tierra Primitiva 8

TABLA III

Propiedades físicas de los precipitados obtenidos en reacciones de condensación y por radiación 32

TABLA IV

Separación de NH_4SCN, glicina y aminoácidos azufrados por electroforesis con alto voltaje 34

TABLA V

Cuantificación de aminoácidos en muestras hidrolizadas 37

TABLA VI

Productos identificados en la mezcla reactiva formada por NH_4SCN, formaldehído, cloruro de amonio, ácido acético y agua 40

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1

Formación del ácido isopertiociánico 11

FIGURA 2

Reacción entre el cianuro y el tiosulfato 12

FIGURA 3

Distribución filogenética de la tiosulfato azufretransferasa 12

FIGURA 4

Diagrama de flujo de la precipitación fraccionada, obtenida en el experimento de síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados 21

FIGURA 5

Espectro de infrarrojo del compuesto formado en la mezcla de NH_4SCN y ácido sulfúrico 22

FIGURA 6

Diagrama de flujo del análisis realizado en el experimento de radiólisis 25

FIGURA 7

Cromatograma obtenido en una columna de intercambio iónico, del precipitado 1 35

FIGURA 8

Análisis de las fracciones por CLAP 38

FIGURA 9

Cromatograma realizado por cromatografía de gases 39

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. ESBOZO HISTORICO SOBRE EL PROBLEMA DEL ORIGEN DE LA VIDA

El origen de la vida es un problema que ha inquietado al hombre desde tiempos inmemoriables. Entre los primeros en buscar una explicación natural del origen de la vida, están los griegos, con Tales de Mileto, Anaxímenes y Anaximandro en el siglo VI a.C. Sin embargo, la idea del "ser" de Parménides (540-470 a.C.) como algo inmutable e inmóvil, influyó no sólo sobre griegos como Platón y Aristóteles, sino también en el pensamiento occidental hasta el siglo XIX. Esto contribuyó a que se tuviera durante mucho tiempo una visión "fijista" del mundo y que por lo tanto, no existieran las condiciones necesarias para reflexionar sobre el origen de la vida (Olea, 1981).

James Hutton (1726-1797), Georges Cuvier (1769-1832) y Charles Lyell (1797-1875) sentaron las bases de la paleontología y geología modernas, y con ello la posibilidad de concebir el surgimiento de organismos ancestrales (Templado, 1982).

La biología del siglo pasado intentó dar varias respuestas al problema del origen de la vida pero fracasó, ya que no se le consideraba desde un punto de vista evolutivo. Una de las principales causas que impedía el desarrollo de un planteamiento evolutivo, fue la idea de que sólo los seres vivos son capaces de sintetizar materia orgánica. Estas ideas

negaban, por lo tanto, un proceso de evolución química previo al surgimiento de la vida, y en consecuencia lo concebían desde un punto de vista mecanicista y como un evento repentino (Ramírez y Aguilar, 1982).

Fue Darwin, sobre todo, quien propició el cambio de pensamiento en la biología moderna, de la noción de tipología a la de población. Antes de él, la mayoría de los biólogos concebían las especies como grupos fijos y eternos ordenados por Dios. Es a partir de Darwin que se origina la teoría moderna de la evolución (Leakey, 1981).

La teoría que de manera independiente postularon Oparin (1924) y Haldane (1929), superó estos obstáculos a la vez que planteó desde una perspectiva evolutiva, las diferentes etapas que condujeron a la aparición de los seres vivos. Ambos autores concibieron la síntesis abiótica de moléculas orgánicas, antes del origen de la vida. Estas moléculas orgánicas se acumularían gradualmente en los mares primitivos y eventualmente originarían moléculas más complejas de relevancia biológica. Posteriormente se separarían de la solución formando coágulos que sujetos a un proceso de "selección natural" primitiva (protoselección natural) darían origen a los primeros organismos (Oparin, 1924; 1972). Oparin y Haldane proponían que los primeros seres vivos, eran heterótrofos que se alimentaban de la materia orgánica producida abióticamente, cuyo agotamiento posterior llevó a la evolución de los primeros autótrofos. En 1972, Oparin resumió su teoría en cuatro principales etapas:

1. Aparición de carbohidratos, cianógenos y sus derivados en el medio interestelar y en la Tierra Primitiva.
2. Síntesis abióticas de monómeros y polímeros en la Tierra Primitiva. Formación de la sopa primitiva.
3. Formación de sistemas polimoleculares con separación de fases y capaces de interactuar con el medio ambiente. Aparición de

los protobiontes.

4. Evolución de los protobiontes. Desarrollo del metabolismo y de estructuras moleculares y supramoleculares a partir de la evolución prebiológica. Aparición de los eubiontes.

Las dos primeras etapas constituyen el período de evolución química, que se define como una serie de procesos físicos y químicos que explican la formación abiótica de compuestos orgánicos de importancia biológica, antes de la aparición de la vida. Las dos últimas etapas corresponden al período de evolución prebiológica y biológica, en donde surgen la organización espacial y temporal que caracterizan a los seres vivos. Al final de la última etapa, surge la evolución biológica con la cual, empieza a operar la selección natural.

Veamos enseguida una muy breve descripción de algunas condiciones, que se piensa existían en la Tierra Primitiva que favorecieron el surgimiento de la vida en nuestro planeta.

1.2. ALGUNOS PLANTEAMIENTOS GENERALES DE EVOLUCION QUIMICA

1.2.1. Duración.

De acuerdo con las evidencias presentes (Stevenson, 1983; Schopf y Walter, 1983), el período de evolución química duró menos de mil millones de años y comprende desde la formación de la Tierra, hace unos 4500 millones de años (Stevenson, 1983), hasta la aparición de los fósiles más antiguos conocidos, que es de unos 3500 millones de años (Schopf y Walter, 1983). Después, el grado de síntesis disminuyó considerablemente. Esto último se debió a 1) que probablemente los compuestos producidos abióticamente fueron consumidos por los primeros organismos; 2) la aparición de una capa de ozono, producto de la fotólisis del agua y del CO_2 *(Levine, 1982), y del desarrollo de los procesos fotosintéticos en los sistemas vivos (Negrón-Mendoza, 1986); y 3) a la aparición de la vida misma, ya que los organismos modifican activamente a su medio ambiente.* [1]

1.2.2. Condiciones de la Tierra Primitiva.

El sistema solar se formó hace unos 4600 millones de años (Stevenson, 1983) como resultado de la condensación de la nebulosa solar. Los planetas internos son más densos debido a que los elementos pesados se condensan a temperaturas tan altas como las existentes en la vecindad del Sol. Las temperaturas más bajas (< -150°C.), que se encuentran en la órbita de Júpiter, favorecen la condensación de gases ligeros, como son hidrógeno, helio, metano y amoníaco (Ferris y Usher, 1983). Ello sugiere que la atmósfera primaria terrestre adquirida durante el proceso de acreción por la captura de gases y polvo de la nebulosa solar, fue perdida muy tempranamente. Posteriormente se formó una atmósfera

[1] Como ejemplo de esta interacción se puede citar el actual desequilibrio químico que presenta la atmósfera terrestre (Lovelock, 1979).

secundaria, producto básicamente de las emanaciones volcánicas (Walker, 1977).

Por lo que respecta a la naturaleza de la atmósfera primitiva, existen desacuerdos en cuanto a su carácter reductor (Urey, 1952) o neutral - oxidante (Ferris, 1987; Harada et. al., 1986; Hartman et. al., 1985; Gibson et., al., 1986), pero en general se acepta que sólo habían trazas de oxígeno libre.

Actualmente se piensa que la atmósfera primitiva estaba constituída principalmente por CO_2, vapor de agua y nitrógeno, con trazas o no de NH_3, CH_4 o H_2. Este modelo se apoya en consideraciones fotoquímicas (Levine, 1982) que indican que, una atmósfera reductora como la propuesta por Urey, no pudo haber existido por mucho tiempo. Asimismo, se han logrado obtener abióticamente compuestos orgánicos aminados y amoníaco (Harada et. al., 1986), asi como HCN, CO_2 y agua (Abelson, 1966), a partir de una atmósfera no reductora.

Hace 3800 millones de años, la temperatura superficial terrestre fue menor de 374 °C (a 221 atm, que constituye el punto crítico para la ebullición del agua). Estas altas temperaturas fueron debidas a que la primera fase en el desarrollo del planeta, estuvo caracterizada por una gran actividad volcánica, intensas lluvias de meteoritos y decaimiento radioactivo. Debido a estas altas temperaturas hubo un desprendimiento de volátiles del manto primitivo, que condujo a la formación de la atmósfera e hidrósfera primitivas. Sin embargo en los océanos, existían temperaturas entre 55 y 100 °C (que corresponden al intervalo de temperatura a la cual cristalizaron los sílex ferruginosos y otros sedimentos químicamente relacionados, presentes en el oeste de Groenlandia y Sud Africa, pertenecientes al Arqueano). Dos mil millones de años más tarde, en el Proterozoico, esta temperatura disminuyó hasta ~ 22 °C; lo

que sugiere que los océanos debieron enfriarse a lo largo del tiempo geológico (Ernst, 1983).

Respecto a la alcalinidad de la hidrósfera primitiva, Sillen (1965), concluyó que a lo largo de la historia de la Tierra, el pH de los océanos ha permanecido relativamente cercano a 8.

1.2.3. Fuentes de energía libre primitivas.

Se han propuesto diversas fuentes de energía en la Tierra Primitiva que pudieron contribuir a la síntesis de compuestos orgánicos. La importancia relativa de una fuente energética dada en las síntesis abióticas, depende de su abundancia y distribución en los océanos, la corteza terrestre y la atmósfera, así como de su eficiencia para inducir reacciones químicas. La eficiencia depende a su vez, del porcentaje de conversión de reactantes en productos y que una vez formados éstos, puedan escapar de la acción destructiva de la fuente (Negrón-Mendoza, 1986).

Algunas de las fuentes de energía, fueron muy abundantes pero poco eficientes ya que, como en el caso de la radiación UV, por su corto intervalo de longitud de onda, las reacciones que provocó se llevaron a cabo en las capas superiores de la atmósfera y probablemente sus productos no alcanzaron a llegar a la superficie terrestre antes de ser degradados. Como puede verse en la Tabla I, la radiación solar produce 260,000 cal/cm^2/año, pero la mayor parte de esta radiación se pierde. Por otro lado, las descargas eléctricas sí podían llegar a la superficie de los océanos y los productos formados no se destruirían, pero su acción sería muy localizada.

TABLA I
ENERGIA DISPONIBLE PARA LA SINTESIS DE COMPUESTOS ORGANICOS *

Fuente	*Energia* $(cal\ cm^{-2})\ año^{-1}$	*Simulación Experimental*
Radiación Solar		
Total	260,000	
Luz UV		*Lámparas UV*
3,000 *A*	3,400	
2,500 *A*	563	
2,000 *A*	41	
1,500 *A*	1.7	
Relámpagos	4	*Descargas eléctricas*
Rayos cósmicos	0.0015	
Radiactividad	0.8	*Ciclotrón, Rayos* γ
Ondas de choque	1.1	*Tubos de choque*
Viento solar	0.2	*Ciclotrones*
Calor de Volcanes	0.13	*Hornos*

* Tomada de Miller et. al., (1976) y Negrón-Mendoza (1980).

La radiación proveniente de elementos radiactivos naturales y de rayos cósmicos, entre otros, ha sido menospreciada como una fuente energética importante en la evolución química. Diferentes experimentos de síntesis prebiótica, en los cuales se emplea la radiación ionizante como fuente de energía (Draganić et. al., 1985; Negrón-Mendoza et. al., 1986), muestran la necesidad de reevaluar su importancia. La Tabla II resume algunas fuentes de energía ionizante, que seguramente existieron en la Tierra Primitiva.

TABLA II.
FUENTES DE ENERGIA IONIZANTE EN LA TIERRA PRIMITIVA *

Fuente	Comentarios
	Seguras
^{40}K	*Vida media* 1.31×10^9 *años*
^{232}Th	*Vida media* 1.41×10^{10} *años*
^{235}U	*Vida media* 0.7×10^9 *años*
^{238}U	*Vida media* 4.5×10^9 *años*
^{244}Pu	*Vida media* 7.6×10^7 *años*
Viento solar	*Importantes sobre todo antes*
Rayos cósmicos	*de la formación del campo magnético terrestre*
	Probables
Reactores nucleares naturales y varios núcleos radiactivos que eran producidos por los procesos de fisión natural en cadena.	*Se producen las mismas radiaciones y radioelementos que en los reactores nucleares artificiales.*
	Posibles
Elementos superpesados en la isla de la estabilidad con números atómicos entre 116 *y* 124.	*Vidas medias calculadas teóricamente entre* 10^8 *y* 10^9 *años. Cálculos más recientes indican* 10^5 *años como máximo.*

* Tomada de Dragonić y Dragonić (1978).

1.3. IMPORTANCIA DEL TIOCIANATO EN LA EVOLUCION QUIMICA Y EN SISTEMAS BIOLOGICOS ACTUALES

A continuación, se mencionarán algunas propiedades químicas de los tiocianatos, fuentes abióticas de los mismos, y su presencia en organismos actuales. Estas cuestiones son importantes debido a que el tiocianato de amonio, fue la materia prima de este trabajo y porque se postula como un compuesto importante para la síntesis de moléculas orgánicas en la Tierra Primigenia.

1.3.1. Preparación de los tiocianatos y algunas de sus propiedades químicas.

El ácido tiociánico existe en dos formas tautoméricas en equilibrio una con la otra: H-S-C≡N o ácido tiociánico y H-NCS o ácido isotiociánico. Este isomerismo se refleja en la existencia de dos series de derivados covalentes, los tiocianatos y los isotiocianatos. Sin embargo, en estado gaseoso, así como en soluciones acuosas y no acuosas, el isoácido predomina sobre el ácido tiociánico.

El ión tiocianato puede prepararse a través de muchas reacciones (Newman, 1975) tales como:

$$CN^- + S \longrightarrow SCN^-$$

$$CN^- + K_2S \longrightarrow KSCN$$

$$CN^- + S_4O_6^{2-} \longrightarrow SO_4^{2-} + S_2O_3^{2-} + SCN^- + 2H^+$$

$$CN^- + R-S-S-R' \longrightarrow RSCN + R'S^-$$

La oxidación del ión tiocianato ocurre con la fisión del enlace S-CN

por lo que se formarán sulfatos o ácidos sulfónicos, dependiendo de si el tiocianato oxidado es orgánico o iónico. De esta manera, el ión SCN^- puede regenerar al grupo ciano (CN^-), utilizando Zn^{2+} como reductor.

Las formas tautoméricas del ácido tiociánico difieren en su distribución electrónica, lo que ocasiona que tengan comportamientos distintos ante reacciones de adición y hacia los nucleófilos. Los isotiocianatos orgánicos reaccionan como si tuvieran un centro positivo en el átomo de carbono, por lo que son susceptibles al ataque nucleofílico. Las reacciones de los tiocianatos orgánicos, originan productos con grupos tiol (RS-), mientras que los isotiocianatos originan derivados de aminas (RNH_2).

El ácido isotiociánico es un ácido fuerte, ya que tiene un pK_a de 0.97 (Broughton y Keller, 1966; Morgan et. al., 1969) por lo que se disocia completamente, en cambio, el tiociánico es débil, con un pK_a de 5.4 (Wagner, 1965).

La hidrólisis del ácido isotiociánico depende de su concentración y de la acidez de la solución en que se encuentra. Si ocurre la hidrólisis, se producen gases que pudieron enriquecer la atmósfera terrestre primitiva.

$$H^+ + HNCS + 2H_2O \longrightarrow H_2S + CO_2 + NH_4^+$$

Por otra parte, si la concentración del ácido es alta, se favorecerá la polimerización. Las soluciones concentradas de ácido isotiociánico en un medio moderadamente ácido, se tornan amarillas, y pueden precipitarse como un producto amarillo cristalino, desprendiendo ácido cianhídrico. Este precipitado, el ácido isopertiociánico, es también llamado hidruro de

xantano.

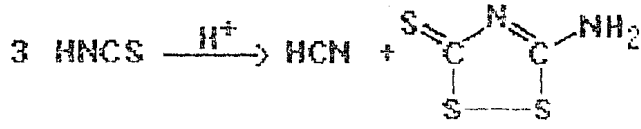
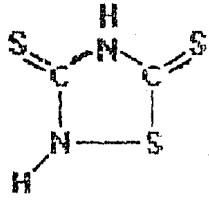
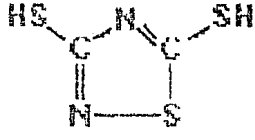


Fig. 1. Formación del ácido isopertiociánico.

El ácido ditiociánico es un polímero del ión tiocianato, que se forma por la reacción entre el isopertiociánico con un álcali fuerte. Cuando se hierven sales del ácido ditiociánico con azufre, se forma el isómero del isopertiociánico (Newman,1975). El ácido pertiociánico existe en dos formas tautoméricas:



I



II

1.3.2. Presencia de los tiocianatos en organismos contemporáneos.

Los tiocianatos se encuentran ampliamente distribuídos en la naturaleza. Por ejemplo, en varias familias de plantas forman glucosinolatos, comúnmente conocidos como los glucósidos del aceite de la mostaza. En los animales, el tiocianato se deriva tanto de fuentes alimenticias, como de síntesis <u>*in vivo*</u> *que se llevan a cabo en la excreción urinaria cuando hay intoxicaciones por cianuro (Newman, 1975). En estas síntesis se utiliza tiosulfato como donador de azufre que se combina con el cianuro para formar el tiocianato. Esta reacción presenta una K de equilibrio de* 10^{-10}.

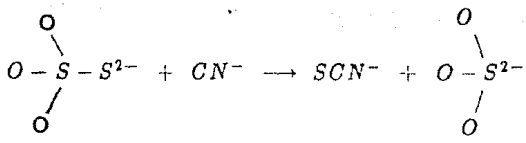


Fig. 2. Reacción entre el cianuro y el tiosulfato.

Una de las enzimas necesarias para la transferencia de azufre, y tal vez la más importante, es la tiosulfato azufretransferasa. Esta es una enzima casi ubicua en la naturaleza (Vennesland, et. al., 1981) ya que se ha encontrado en plantas (Chew y Boey, 1972), en hongos (Oi, 1973), actinobacterias (Yamamoto y Oi, 1977), y en varias bacterias (Sörbo, 1975; Westley, 1973) así como en todos los phyla del reino animal (Schlewelbein et. al., 1969). De acuerdo a este árbol filogenético, se puede deducir que si dicha enzima se encuentra presente en los Procariontes y en los tres reinos de Eucariontes, entonces también debe estar en el reino Protista.

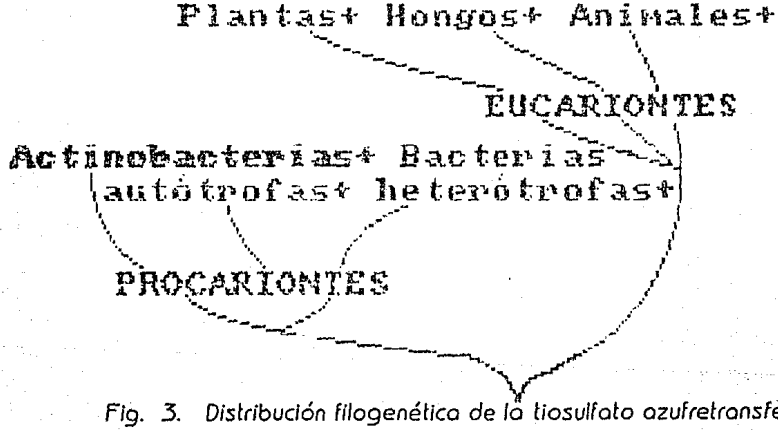


Fig. 3. Distribución filogenética de la tiosulfato azufretransferasa.
+ Indica presencia de la enzima.

1.3.3. Importancia del tiocianato en la evolución química.

El tiocianato es un compuesto importante en estudios de evolución química porque constituye una posible vía de síntesis abiótica de aminoácidos azufrados. En manantiales geotermales o troneras, se forma abióticamente por la reacción del HCN con azufre o sulfuros (Dowler e Ingmanson, 1979; Muhkin, 1974); puede formarse por combinación de CO_2, NH_3, y H_2S, provenientes de emanaciones volcánicas (Gautier, 1901; 1910). También, en experimentos de evolución química se ha demostrado la formación de tiocianato de amonio, en condiciones que simulan las de la Tierra Primitiva. Heyns, et. al. (1957) trabajaron con varias mezclas de gases en condiciones no oxidantes. Al agregar H_2S, se producía tiocianato de amonio, tiourea y tioacetamida. Asimismo, se ha detectado recientemente la existencia del ácido isotiociánico en el medio interestelar (Irvine et. al., 1987). La presencia de este compuesto en el medio interestelar, sugiere que puede existir en cometas, lo que abre la posibilidad de una fuente adicional de este compuesto en la Tierra Primigenia, debido a colisiones.

Son pocos los experimentos de síntesis prebiótica en los cuales se han obtenido aminoácidos azufrados, partiendo de compuestos inorgánicos que contengan azufre (Choughuley y Lemmon, 1966; Steinman et. al., 1968; Bhadra y Ponnamperuma, 1986; Getoff y Schenck, 1982). Es por esta razón que se considera al tiocianato como un compuesto potencialmente importante en la síntesis de aminoácidos azufrados.

1.3.4. Experimentos prebióticos con SCN^-.

Alfonso L. Herrera fue el primer investigador que empezó a hacer experimentos prebióticos en México. Para estudiar cómo se originó la vida, Herrera utilizó compuestos que no provenían de los seres vivos, como son, por ejemplo el tiocianato de amonio y el formaldehído. Posteriormente, se

identificaron esos compuestos como materias primas orgánicas presentes en nuestra galaxia (Fox y Dose, 1977).

Alfonso Herrera nació en la ciudad de México en el año de 1868 y murió en su laboratorio el 17 de Septiembre de 1942. Desde 1897, se dedicó a la "Plasmogenia" (ciencia que estudia la generación del citoplasma); en donde trataba de reproducir en el laboratorio, estructuras y funciones de los seres vivientes.

En 1942, en la revista Science, Herrera publicó su último trabajo de investigación denominado "A New Theory of the Origin and Nature of Life" , en donde describe cómo preparar los colpoides (estructuras con movimientos amiboides). En este trabajo, reportó la existencia de estructuras formadas a partir de la reacción del formaldehído con el sulfocianuro o tiocianato de amonio, con morfología muy parecida a cortes histológicos de vegetales, granos de polen y espermatozoides de mamíferos. Reportó también vestigios de almidón, la síntesis de dos aminoácidos, un producto de condensación de carácter proteinoide y glóbulos de pigmentos verdes, rojos y amarillos (Herrera, 1942).[2]

Años más tarde, Steinman y colaboradores hicieron diversos experimentos prebióticos utilizando tiocianato de amonio. En uno de ellos publicaron la formación de estructuras parecidas a células, por la reacción del tiocianato de amonio con el formaldehído (Smith et. al., 1968). En otro, se produjo metionina por la irradiación UV de una solución 0.1 M de tiocianato de amonio (Steinman et. al., 1968). Un año después, estos autores obtuvieron microesferas por la irradiación UV de tiocianato de amonio, que al ser comparadas con algunos fósiles del Precámbrico, desde el punto de vista morfológico, químico y físico, les llevó a sugerir

[2]Para más información sobre la vida y obra de Alfonso L. Herrera, consultar las referencias de Beltrán, 1968; 1983; y Río del, 1983).

un posible origen abiótico de dichos fósiles (Smith et. al., 1969). En 1971 Smith y otros autores irradiaron con luz UV una solución de tiocianato de amonio, glicina y fierro con agua de mar artificial, que ellos comparan con microesferas parecidas a células dotadas de actividad catalítica de peroxidasa (Smith et. al., 1971).

1.4. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo pueden enunciarse de la siguiente manera:

a) *Sintetizar algunos compuestos orgánicos de importancia biológica, que se pudieron formar abióticamente, tales como aminoácidos, ácidos carboxílicos y heterociclos que pueden producirse vía el tiocianato o a través del cianuro por oxidación del ión tiocianato. En particular, se trata de detectar la formación de aminoácidos azufrados, ya que a pesar de su importancia, y que son aminoácidos esenciales, no se cuenta con una síntesis abiótica satisfactoria.*

b) *Reproducir algunos de los experimentos de Alfonso L. Herrera con tiocianato de amonio (realizados en 1933) para sintetizar aminoácidos. Para su detección se utilizarán instrumentos de análisis más precisos como la cromatografía de gases (C.G.) y cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP), acoplada a un detector de U.V.*

c) *Utilizar diferentes fuentes energéticas, como radiación gamma y energía térmica.*

CAPITULO II

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.1. PURIFICACION DE REACTIVOS UTILIZADOS

2.1.1. Agua tridestilada.

El agua destilada comercial fue redestilada sucesivamente de una solución ácida de dicromato de potasio, de una solución alcalina de permanganato de potasio y finalmente sin agregar ningun reactivo. Con ello se oxidan los posibles impurezas orgánicas presentes (Draganić y Draganić, 1971).

2.1.2. Solventes y Reactivos Químicos.

Los métodos utilizados para la purificación de metanol, butanol y benceno fueron los recomendados por Perrin et. al., (1980). Otros reactivos fueron de la más alta calidad encontrada en el mercado. Tal es el caso del formaldehído, tiocianato de amonio, cloruro de amonio, cianuro de potasio, hidróxido de bario, glicina, alanina, metionina, taurina, cistina, cisteína, ácido acético y ácido sulfúrico.

2.2. PREPARACION DEL MATERIAL DE VIDRIO

El equipo de vidrio utilizado para irradiar fue lavado con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico en caliente, posteriormente se enjuagó con agua tridestilada y finalmente se calentó en una mufla a 500 ° C durante una noche (Swallow, 1960).

2.3. CONDENSACIONES TERMICAS CON TIOCIANATO DE AMONIO

2.3.1. Síntesis de la glicina según Klages (1903), Ling y Nanji (1922).

Este es un experimento lateral que se hizo con el objeto de entender el mecanismo de formación de la glicina, y los experimentos para síntesis de aminoácidos efectuados por Herrera.

A 100 ml de formaldehído al 37 % se le agregaron 36 g de cloruro de amonio. Esta solución se vertió en un matraz de tres bocas, el cual se colocó en el interior de un cristalizador con hielo. Se agitó durante todo el experimento con un agitador mecánico con aspas de teflón, que se introdujo en la boca central del matraz.

Por otro parte, se disolvieron 44 g de cianuro de potasio en 60 ml de agua destilada comercial, y esta solución se fue agregando lentamente al matraz de tres bocas durante media hora con ayuda de un embudo de adición. En esta etapa se mantuvo la temperatura por debajo de los 10 ° C. Cuando se añadió aproximadamente la mitad de la solución de cianuro de potasio, se empezaron a gotear simultáneamente 25 ml de ácido acético glacial y se agitó durante dos horas más. El producto (metilen-aminoacetonitrilo) se filtró con vacío en un embudo Buchner y se secó en una estufa a 50 ° C, se pesó, se determinó su punto de fusión, se hizo una cromatografía en capa fina, utilizando como disolvente el sistema formado por propanol, amoníaco y agua en proporción 6:3:1, y una espectroscopía de infrarrojo (I.R.). Las principales bandas en el I.R. son: la vibración de tensión ("stretching") del C-H de tipo metilénico; en los 2975 cm^{-1}; la banda en los 2840 cm^{-1}, corresponde a la vibración de tensión C-H del CH_2; y la banda de la frecuencia vibracional C=C, en los 1460 cm^{-1}.

Posteriormente, se agregó un gramo del metilen-aminoacetonitrilo a

10 ml de una solución de hidróxido de bario al 40 % que se calentó a ebullición en un vaso de precipitado. Se calentó hasta que ya no desprendió más amoníaco, lo que se comprobó mojando papel tornasol con agua y exponiéndolo a los vapores. El cambio de color a morado es una prueba positiva de la presencia de amoníaco. El volumen se controló con agua destilada.

Se agregó ácido sulfúrico para precipitar el bario. Se filtró y lavó con ácido sulfúrico hasta que la solución tuviera un 3 % del ácido, y después se hirvió en un vaso de precipitado durante unas cuatro horas para evaporar el formaldehído. Para remover el ácido sulfúrico, se añadió hidróxido de bario al 40 % hasta que la solución no precipitó más. Se filtró nuevamente y el precipitado se decoloró hirviéndolo con carbón activado, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad en un rotavapor. La glicina asi formada se recristalizó con etanol, se pesó, se le tomó punto de fusión y se obtuvo su espectro de I.R., que presentó como bandas principales, las siguientes: en 3180 cm^{-1} la vibración de tensión del N-H, correspondiente al NH_2; la vibración C-H del CH_2 en 2925 cm^{-1}; en 1620 cm^{-1} la banda del C=O; la vibración del C-N en 1520 cm^{-1} y la banda del C-O en 1415 cm^{-1}.

2.3.2. Síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados.

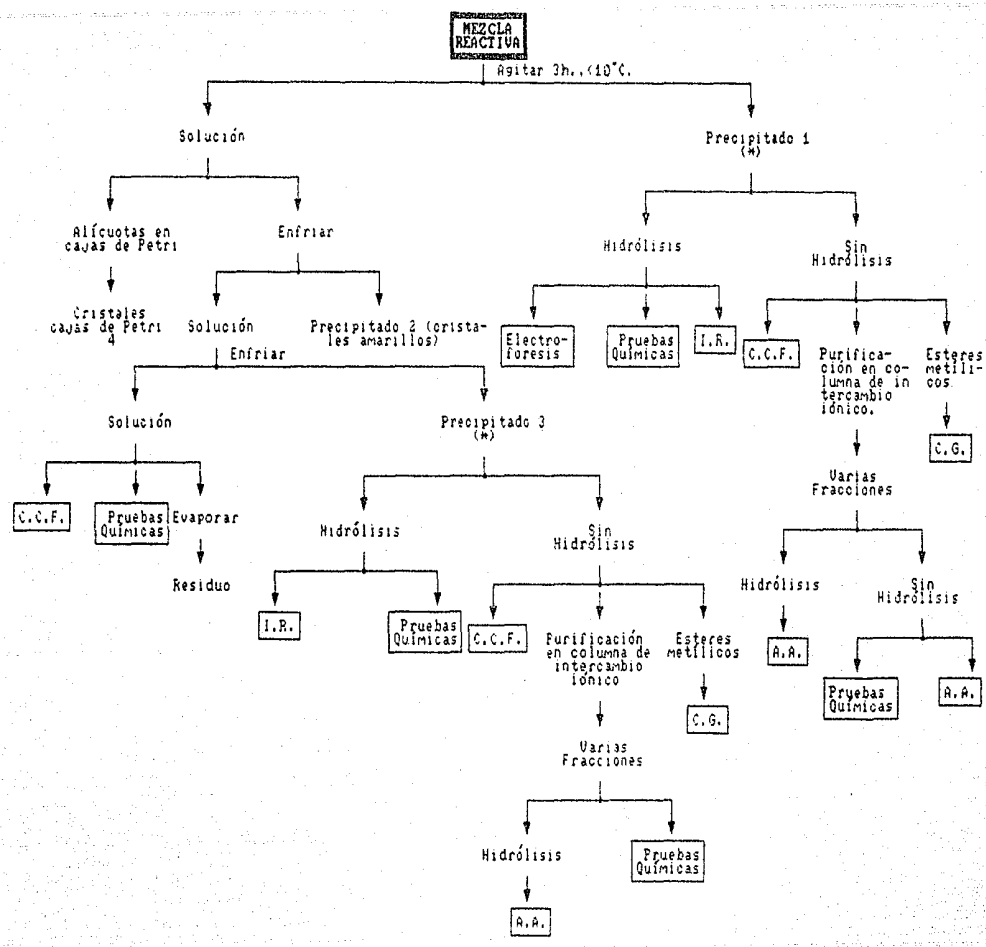
Los experimentos que a continuación se van a describir fueron realizados por A.L. Herrera para la síntesis de aminoácidos, en particular de glicina, cistina y cisteína. (Herrera, Cuadernos de trabajo 1931-32, 1932-33 y 1933-34; Herrera, 1932 a, b, c, d; Herrera, 1933). Se siguió un procedimiento análogo al de la síntesis de glicina a partir de formaldehído y cianuro de potasio, con la excepción de que, en lugar de este último, se utilizó tiocianato de amonio. Se mezclaron los siguientes reactivos: 20 ml de formaldehído, 40 g de tiocianato de amonio, 36 g de cloruro de amonio, 60 ml de agua destilada y 25 ml de ácido acético glacial.

La mezcla resultante se agitó con un agitador mecánico por espacio de tres horas.

Posteriormente, se pusieron 2 ml de la mezcla en dos cajas de Petri que se metieron en un frasco de boca ancha; a éste, a su vez, se le pusieron 5 ml de la misma mezcla con objeto de tener una atmósfera saturada. Al frasco se le untó grasa en la boca y se tapó con una caja de Petri grande. Se guardó en un congelador durante 21 horas. El resto de la mezcla se filtró al vacío, el filtrado se guardó en el refrigerador y el precipitado 1 (formado por cristales blancos uniformes y amarillos con apariencia resinosa) se secó con aire para analizarlo después.

Debido a que hubo una precipitación fraccionada, el filtrado se filtró dos veces más, con lo que se obtuvieron otros dos precipitados. El 2 consistió en cristales granulares color mostaza, y el 3 estaba formado por cristales blancos y amarillos. Al filtrado se le hizo la prueba del tiocianato y del formaldehído (ver Apéndice, incisos 1a y 2.1), así como una cromatografía en capa fina, que se realizó en una placa de gel de sílice $60F_{254}$ de Merck, en la que se puso una gota de glicina como referencia. Para este propósito, se utilizó una cámara Gelman modelo 51325-1 que se saturó 24 horas antes. Como disolventes se utilizaron etanol y el sistema formado por propanol, amoníaco, agua 6:3:1 vol. a vol.

La figura 4 muestra un diagrama de flujo de la precipitación fraccionada que se tuvo en este experimento, en donde las siglas A.A. significan análisis de aminoácidos; C.C.F., cromatografía en capa fina; C.G., cromatografía de gases; e I.R., infrarrojo. Las pruebas químicas que se realizaron corresponden a las citadas en los incisos 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 del Apéndice.



(*) Estos precipitados estaban formados por cristales blancos y amarillos; en el caso del precipitado uno, se trabajó con los cristales amarillos, y en el del precipitado tres, con los blancos.

A todos los precipitados se les determinó su punto de fusión, I.R., solubilidad, y se realizó una cromatografía en capa fina.

Fig. 4.

2.3.3. Estudios complementarios con algunos de los componentes de la mezcla de reacción.

A) Formación de ácido isopertiociánico.

a) Se mezcló una solución concentrada de tiocianato de amonio, y una solución de ácido sulfúrico al 50 % y se mantuvo en hielo. Casi inmediatamente, la mezcla tomó un color amarillo y empezó a precipitar un sólido del mismo color. Posteriormente se filtró al vacío y se secó. Se le determinó su punto de fusión y se obtuvo su I.R., que se muestra en la Fig. 5. Los cristales no fundieron al llegar a los 300 °C.

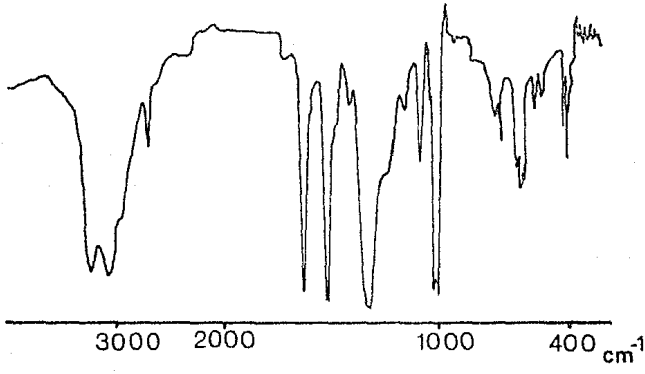


Fig. 5. Espectro de I.R. del compuesto formado en la mezcla de tiocianato de amonio y ácido sulfúrico.

b) Se hicieron reaccionar tiocianato de amonio y formaldehído, en proporción 1:1. La mezcla se puso primero aceitosa y poco a poco se fue tornando amarilla, hasta que se precipitaron unos cristales amarillos. Se les determinó su punto de fusión y se les hizo una espectroscopía de I.R. Los cristales fundieron entre los 102 y 119 °C. El infrarrojo de este

compuesto no presenta la banda de C=O en 1760 cm^{-1}, ni la vibración C-H en los 2850 cm^{-1} del aldehído, por lo que debe ser una mezcla entre el ácido isopertiociánico y un compuesto de adición con el formaldehído.

B) Formación de ácido isoditiociánico.

a) 5 g de NH_4SCN y 7 ml de anhídrido acético, se pusieron a reflujo durante una hora. Se vertió la mezcla en agua fría, y precipitaron de inmediato unos cristales cafés, éstos se filtraron, se secaron (Johnson, et. al., 1915) y se les determinó su punto de fusión y espectro de I.R. El precipitado se descompuso entre los 145 y 200 °C. Sus principales bandas en el I.R. son: en 3180 cm^{-1} la vibración del N-H; la banda C≡ N, en 2049 cm^{-1}; la vibración del C=N en 1542 cm^{-1} y en 1131 cm^{-1}, la banda correspondiente a la vibración del C=S.

b) También se mezclaron tiocianato de amonio y ácido acético glacial en las mismas proporciones que en el experimento anterior, y se siguió el mismo procedimiento. Se observaron las siguientes bandas principales en el I.R.: la vibración de tensión del N-H en 3154 cm^{-1}, en 2037 cm^{-1} la vibración correspondiente al C≡ N, la banda del C=N en 1396 cm^{-1} y una banda muy débil en 1131 cm^{-1}, correspondiente a la vibración C=S.

2.4. IRRADIACION DE MUESTRAS. EXPERIMENTO DE RADIOLISIS

2.4.1. Fuente de Irradiación.

Se utilizó la fuente de irradiación Gammabeam 651 PT, de alta intensidad la cual posee una actividad nominal de 1.85 x 10^{15} Bq (50,000 Ci) Esta fuente se encuentra ubicada en el Instituto de Ciencias Nucleares, U.N.A.M.

2.4.2. Preparación de Muestras para Irradiación.

Se mezclaron y agitaron levemente 10 ml de formaldehído al 37 %, 20 g de tiocianato de amonio, 18 g de cloruro de amonio, 30 ml de agua tridestilada, 13 ml de ácido acético glacial, y se vaciaron en tres tubos de ensayo destapados.

2.4.3. Dosis de Irradiación.

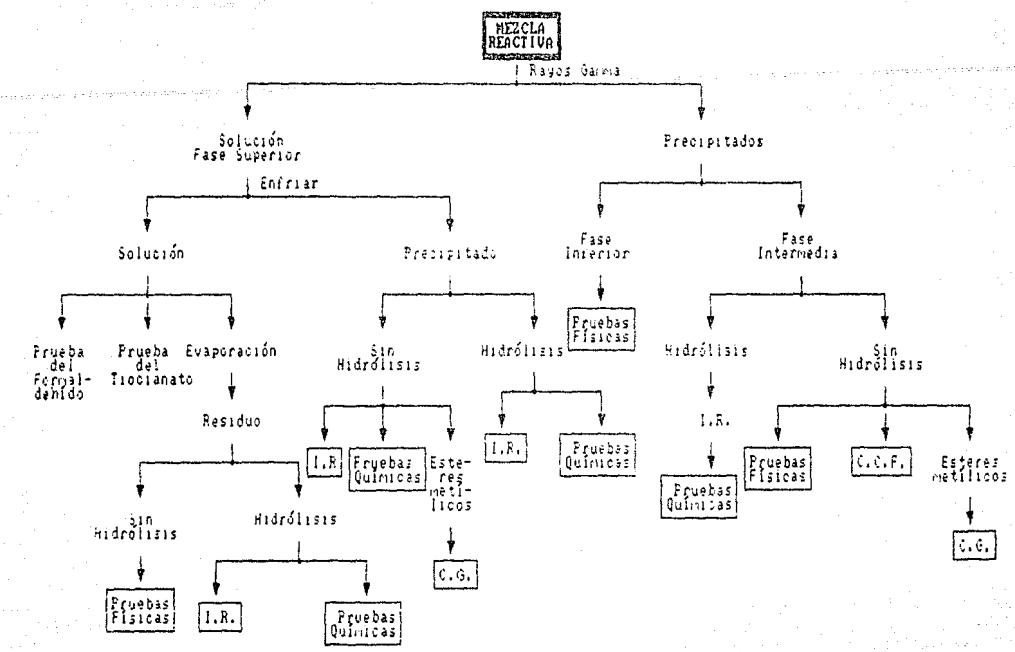
Los tubos de ensayo se colocaron en un soporte metálico dentro de la fuente de irradiación, a una intensidad de dosis promedio de 10.6 kGy/h (1.06 Mrad/h) durante dos horas (Perezgasga et. al, 1988).

2.4.4. Tratamiento de las Muestras Posterior a la Irradiación.

Después de la irradiación se formaron tres fases en los tubos: una fase superior acuosa color amarillo; una fase intermedia compacta color anaranjado-café; y una fase inferior granulosa color amarillo. Se separaron las tres fases para ser analizadas posteriormente.

La fase superior acuosa se metió un día al refrigerador y después se filtró al vacío. Al filtrado se le hizo la prueba del tiocianato y del formaldehído (ver Apéndice incisos 1a y 2.1). Se evaporaron 43 ml en el rotavapor y al residuo se le determinó su punto de fusión e I.R. y se hidrolizó. Al hidrolizado se le hizo otro I.R., y pruebas químicas para detectar glicina (ver Apéndice, incisos 2.1, 2.2 y 2.3).

La Figura 6 es un diagrama de flujo que muestra el esquema general, del análisis realizado para este experimento. Las siglas utilizadas en esta figura, son las mismas que las de la Figura 4.



Las pruebas físicas, consistieron en determinar a cada precipitado, su punto de fusión, su espectro de I.R. y solubilidad.

Fig. 6.

Todos los precipitados, tanto los de las muestras irradiadas como los de las no irradiadas, se secaron con vacío y aire, se les determinó su peso, punto de fusión y su solubilidad en agua, acetona, acetato de etilo, etanol, benceno y cloroformo. Se les hizo también, una cromatografía en capa fina en la que se usó como disolvente el sistema de propanol, amoníaco, agua 6:3:1 vol. a vol. Se depositó una gota de cada uno de los precipitados disueltos en agua destilada y una gota de una solución de glicina como referencia. Las manchas se evidenciaron con luz UV y con ninhidrina.

Con base en los puntos de fusión e I.R., se trabajó con los precipitados 1 (cristales amarillos) y 3 (cristales blancos) del experimento de síntesis de glicina y aminoácidos azufrados. En cuanto a los precipitados obtenidos durante la irradiación (precipitado de la fase inferior, de la fase intermedia, y el del filtrado) se trabajó con el precipitado de la fase intermedia y con el del filtrado. Todos, excepto el precipitado de la fase inferior, se hidrolizaron, se les determinó su espectro de I.R., y se les hicieron pruebas químicas para detectar glicina (Ver Apéndice, incisos 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4). También se esterificaron para analizarlos por cromatografía de gases y verificar si había formación de ácidos carboxílicos.

2.5. TECNICAS ANALITICAS GENERALES

2.5.1. Hidrólisis.

Se disolvieron 10 mg de cada muestra en 5ml de HCl 6N y se metieron en una estufa a 100° C durante 20 horas. Posteriormente se secaron totalmente las muestras bajo una corriente de aire.

En el caso de los precipitados a los que se les realizó el análisis de identificación y cuantificación de aminoácidos (precipitados 1 y 3 del

experimento de síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados), se hidrolizaron con HCl grado secuencial (ampolletas de 1 ml de Pierce para hidrólisis de péptidos y proteínas), ácido acético glacial para CLAP y agua grado CLAP.

2.5.2. Electroforesis con alto voltaje en papel.

Se hizo electroforesis con alto voltaje del precipitado 1 hidrolizado (cristales amarillos) del experimento para sintetizar glicina y amino-ácidos azufrados, de acuerdo al método propuesto por Torres et. al. (1981). El amortiguador utilizado, pH=8.5, fue preparado de la siguiente manera:

4.4 g de barbital de sodio
4.7 g de acetato de sodio
30 ml de ácido acético 0.1 N
se afora a 1000 ml con agua bidestilada

El pH se puede ajustar con unas gotas de una solución de NaOH al 10 % o de ácido acético al 36 % (Grafton y Rabinowit, 1967).

El electroforetograma se reveló con vapores de iodo (ver Apéndice, inciso 1b), debido a que la ninhidrina no es muy sensible.

Con esta técnica, se analizaron muestras patrón de tiocianato de amonio, glicina, alanina, cistina, cisteína, taurina y metionina, ya que estos aminoácidos son factibles de sintetizarse a partir del tiocianato de amonio. Los electroforetogramas de las primeras cinco muestras fueron revelados con ninhidrina, y el de la metionina con azida de iodo (ver Apéndice incisos 2.4 y 1c, respectivamente).

2.5.3. Purificación de precipitados del experimento de síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados, por medio de una columna de intercambio iónico

Por medio de esta técnica, se purificaron 1.00 g del precipitado 1 (cristales amarillos), en dos corridas de 500 mg cada una, y 90 mg del precipitado 3 (cristales blancos), ambos sin hidrolizar, del experimento de síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados, de acuerdo con el método propuesto por Siuda (1982). De cada uno de los precipitados, se obtuvieron varias fracciones; a cada una de ellas se les hicieron diferentes pruebas químicas (ver Apéndice, incisos 2.1, 2.2 y 2.3). Posteriormente éstas fracciones se evaporaron a un ml aproximadamente, y se liofilizaron para efectuar un análisis de aminoácidos.

2.5.4. Identificación y cuantificación de aminoácidos por cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) acoplada a un detector de U.V.

Estos análisis fueron realizados en la Unidad de Aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

Para poder usar esta técnica analítica, es necesario derivatizar las muestras (una vez purificadas y liofilizadas) con orto-ftaldehído (Lindroth y Moppen, 1979).

Se utilizó un sistema cromatográfico modular de Beckman Instruments serie CLAP, con programador de disolventes, válvula de inyección y detector de longitud de onda variable. La columna usada fue la C_{18}, (250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interior) con un tamaño de partícula de 5μ. Los análisis se efectuaron a temperatura ambiente, a una longitud de onda de 340 nm y en el intervalo de 0.01 AUFS.

Con una mezcla de referencia Beckman, a la cual se le adicionaron ácido β-aminoisubutírico (β-AIBA) y taurina, se determinaron los tiempos

de retención de varios aminoácidos, proteínicos y no proteínicos, entre los cuales estaban los que eran factibles de sintetizarse a partir de la mezcla reactiva, que contenía como materia prima tiocianato de amonio.

Se hidrolizaron las fracciones del precipitado 1 y las del 3, del experimento de síntesis de glicina y aminoácidos azufrados, con las condiciones de operación mencionadas. Las fracciones obtenidas al purificar los restantes 500 mg. del precipitado 1 se analizaron sin hidrolizar (Ladrón de Guevara y Bolívar, 1985; Ladrón de Guevara et. al., 1985; Negrón-Mendoza et. al., 1988).

2.5.5. Cromatografía de gases.

Para analizar ácidos carboxílicos que posiblemente llegaran a formarse en este sistema, se requiere que previamente se transformen a ésteres metílicos. Los ésteres se preparan agregando una solución de HCl 4M en metanol, con el objeto de esterificar e hidrolizar simultáneamente. La mezcla se calienta durante 60 minutos entre 80 y 100 °C., después se enfría y se extraen los ésteres con cuatro ml de benceno y un ml de agua, y luego, con sólo cuatro ml de benceno. El extracto bencénico, libre de agua, se evapora bajo una corriente de aire, hasta obtener un volumen de 0.2 ml (Negrón-Mendoza y Navarro-González, 1982).

Los ésteres se corrieron en el cromatógrafo de gases Varian serie 3700, con detector de ionización de flama. La columna usada para este análisis fue de acero inoxidable de cuatro pies de longitud, 1/8 de pulgada de diámetro y empacada con Reoplex 400 al 10 % en chromosorb W, lavado con ácido y tratado con dimetil-silano. El flujo de los gases fue: 300 ml/min para el aire y 30 ml/min para el hidrógeno; el gas acarreador fue el nitrógeno, con un flujo de 30 ml/min. La temperatura fue programada de 60 a 200 °C, con incrementos de 4 °C/min.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1. EXPERIMENTOS POR CONDENSACIONES TERMICAS Y POR RADIACIONES

3.1.1. Propiedades físicas de los precipitados.

De los experimentos realizados se obtuvieron diferentes precipitados. La Tabla III resume algunas de sus propiedades físicas.

3.1.2. Espectros de Infrarrojo.

Las características esenciales que aparecen en los espectros de I.R. de los diferentes precipitados son las siguientes:

Una banda intensa en la región de los 3140 cm^{-1}, la forma de tensión ("stretching") para la vibración N-H con 'hombros' en 2800 cm^{-1}. Todos los espectros muestran la banda en 2050 cm^{-1} del grupo S-C≡N, que indican que aún persiste el ión tiocianato, además de una banda muy pequeña que corresponde al grupo C=O, en la región de 1700-1600 cm^{-1}.

Otra vibración muy intensa presente en todas las muestras, corresponde a 1400 cm^{-1}, la cual es debida a la vibración C=N.

Las características de otras bandas parecen indicar que los precipitados 1 y 3 (cristales amarillos), son el mismo compuesto. Dadas las posiciones de las bandas tales como N-H, en 3190 cm^{-1}, C=N en 1515 cm^{-1}, C=S en 1006 cm^{-1}, C=O a 1667 cm^{-1}, se atribuyen a la formación

de ácido isopertiociánico.

Después de la hidrólisis ácida, los espectros obtenidos muestran un incremento en la banda correspondiente a la vibración de tensión del carbonilo, alrededor de 1630 cm^{-1}.

En las muestras irradiadas se obtienen prácticamente los mismos compuestos. La fase superior y la intermedia muestran un espectro de I.R. idéntico, y por la posición de sus principales bandas, se sugiere que corresponden a las del ácido isopertiociánico.

El análisis de los espectros de I.R. de los precipitados de los estudios complementarios, sugiere que en la mezcla de tiocianato de amonio con formaldehído, parte del precipitado amarillo corresponde a la formación de ácido isopertiociánico, ya que este último no funde al llegar a los 300 °C, y el precipitado amarillo funde entre los 102 y 119 °C. En cuanto a la mezcla de tiocianato de amonio con anhídrido acético, y con ácido acético glacial, se tiene en ambos, la formación de ácido isoditiociánico.

TABLA III
PROPIEDADES FISICAS DE LOS PRECIPITADOS OBTENIDOS EN REACCIONES DE CONDENSACION Y POR RADIACION.

Precipitado	*Peso*	*Color*	*Punto de fusión (°C.) (no purificado)*	*Observaciones*
	Mezcla	*no*	*irradiada*	
1	24.92 *g*	*amarillo*	160 – 185	*No estaba puro. Habían cristales blancos similares a los del precipitado* 3.
2	4.05 *g*	*amarillo*	155 – 190	
3	0.32 *g*	*blanco*	190 – 260	
3	0.30 *g*	*amarillo*	115 – 135	
Cristales Petri 4	< 0.01 *g*	*blanco*	*d.* 270	
Residuo Filtrado	36.57 *g*	*crema*	114 – 126	
	Mezcla	*Irradiada*		
Fase inferior	12.34 *g*	*amarillo*	115 – 127	
Fase intermedia	1.84 *g*	*anaranjado*	110 – 125	
Fase superior filtrada	2.13 *g*	*amarillo*	148 – 163	
Residuo de la fase superior filtrada	19.75 *g*	*amarillo*	97 – 115	

3.2. FORMACION DE AMINOACIDOS

La identificación de aminoácidos que pudiesen formarse en este sistema, se realizó por varias técnicas, tales como electroforesis con alto voltaje, pruebas químicas cualitativas y CLAP. Estas pruebas, que se mencionan más adelante, se realizaron con los precipitados originales, así como con los precipitados hidrolizados y con las fracciones obtenidas después de una purificación a través de una columna de intercambio iónico. A continuación se analizan los resultados obtenidos.

3.2.1. Pruebas químicas cualitativas.

Estas consisten en pruebas químicas específicas que se realizaron para detectar la formación de glicina, así como la presencia de tiocianato y de formaldehído (ver Apéndice, incisos 1a, 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4). Los resultados obtenidos muestran que los hidrolizados dieron prueba positiva a la glicina.

3.2.2. Electroforesis con alto voltaje en papel.

Se analizaron muestras estándares de tiocianato de amonio, glicina, alanina, metionina, cistina, cisteína y taurina; sus valores de rf se encuentran resumidos en la Tabla IV. Los resultados obtenidos del precipitado 1 ya hidrolizado, muestran la presencia de un compuesto con Rf similar al de la glicina.

TABLA IV
SEPARACION DE NH_4SCN, GLICINA Y AMINOACIDOS AZUFRADOS POR ELECTROFORESIS CON ALTO VOLTAJE.

Compuesto	Rf
Metionina	2.0 *cm* (*polo negativo*)
Glicina	2.5 *cm* (*polo negativo*)
Precipitado 1 hidrolizado	2.7 *cm*(*polo negativo*)
Alanina	3.4 *cm* (*polo negativo*)
Taurina	3.8 *cm* (*polo negativo*)
Cistina	2.5 *cm* (*polo positivo*)
Cisteína	4.6 *cm* (*polo positivo*)
SCN^-	43.6 *cm* (*polo positivo*)

3.2.3. Purificación de precipitados en una columna de intercambio iónico.

El procedimiento de separación en fracciones, en la columna SP-Sephadex cm-25, dió cinco o seis picos de cada uno de los precipitados obtenidos en el experimento por condensaciones térmicas.

Un cromatograma típico de este fraccionamiento se muestra en la Fig. 7.

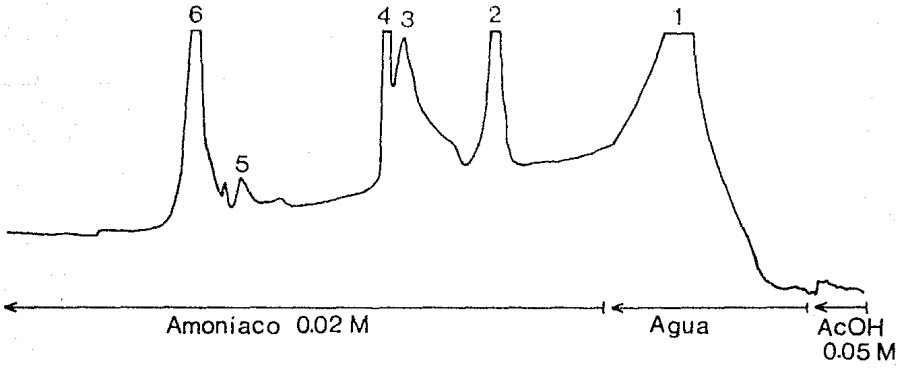


Fig. 7 Cromatograma obtenido en una columna de intercambio iónico, del precipitado 1.

Resultados preliminares con la prueba específica para glicina (ver inciso 2.4 del Apéndice), con un límite de detección de 3 µg., dieron prueba positiva.

El primer pico, que eluye en el agua corresponde al ión tiocianato que no reaccionó. Las otras fracciones fueron liofilizadas y analizadas por CLAP.

3.2.4. Identificación y cuantificación de aminoácidos por CLAP.

Los cromatogramas obtenidos por CLAP revelan la presencia de cinco compuestos, cuyos tiempos de retención corresponden a glicina, alanina, cisteína, metionina y ácido β - aminoisobutírico (β-AIBA). De estos

aminoácidos, sólo la cisteína y la metionina contienen azufre. Aunque se analizaron muestras tipo de otros aminoácidos azufrados, tales como taurina y cistina, se obtuvieron varios picos cuyos tiempos de retención no coincidieron con los de aquéllos, o bien se traslaparon con el pico del reactivo orto-ftaldehído (OPA). Estos resultados fueron encontrados en los cristales blancos de los precipitados 1 y 3, tanto en las muestras hidrolizadas como en las no hidrolizadas.[3]

También se observaron otros picos en el cromatograma que no se pudieron identificar, y que probablemente correspondan a aminoácidos no proteínicos, tiourea o alquilaminas. La identificación final de estos compuestos debe hacerse mediante el examen detallado de los espectros de masas, que aún no se realizan.

Los rendimientos de formación de los aminoácidos, fueron muy bajos y se determinaron mediante la integración electrónica de las áreas de los picos; estos resultados, que son reproducibles, se presentan en la Tabla V. Las primeras cuatro muestras, corresponden al precipitado 1 y las siguientes cuatro, al precipitado 3 del experimento de síntesis de la glicina y de aminoácidos azufrados.

[3]Los resultados por CLAP del precipitado 1, constituído por cristales blancos y amarillos que no pudieron ser separados por recristalización, se atribuyen a los cristales blancos.

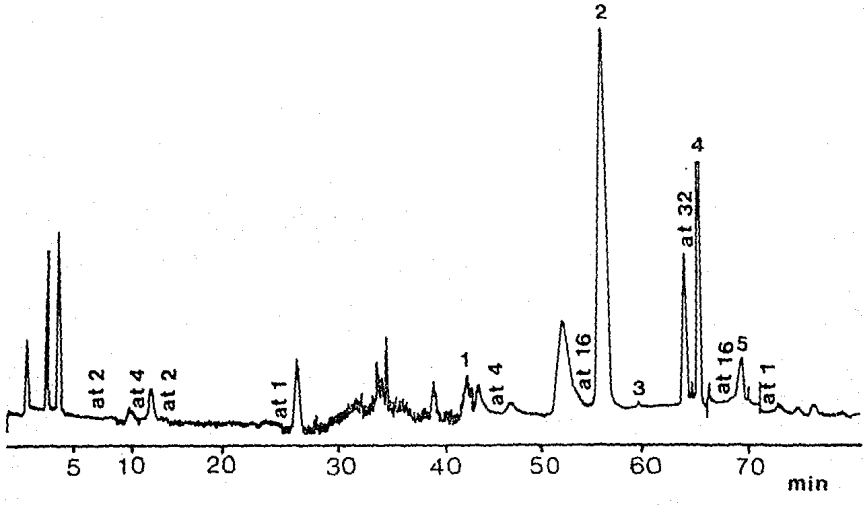
TABLA V
CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS EN MUESTRAS HIDROLIZADAS

No. de muestra	*Glicina**	*Alanina**	*β − AIBA**	*Metionina**	*Cisteína**
1	19	315	2	22	109
2	3	495	23	74	⋆
3	*Trazas*	627	2	27	191
4	*Trazas*	192	⋆	29	215
5	4	259	1	1	132
6	3	62	⋆	4	23
7	63	642	⋆	22	288
8	20	205	⋆	23	91

* *Concentración[=] nmoles/mg muestra*
⋆ *La sensibilidad del equipo no permitió detectar a estos aminoácidos.*

El análisis de las fracciones hidrolizadas, mostró la presencia de los mismos aminoácidos que las fracciones no hidrolizadas, en concentraciones ligeramente mayores. En ambos casos, la alanina es el aminoácido más abundante.

En la Fig. 8 se muestra un cromatograma típico de una de las fracciones colectadas y analizadas por esta técnica.



1. Glicina; 2. Alanina; 3. Beta-AIBA; 4. Cisteína; 5. Metionina.

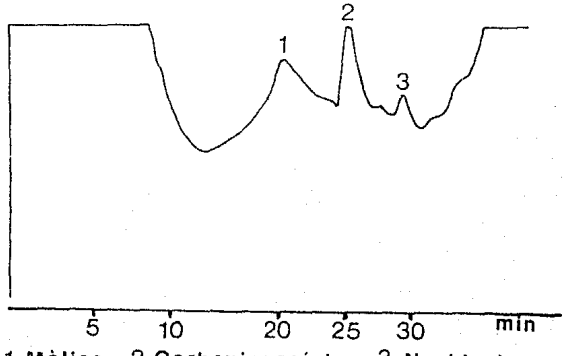
Fig. 8 Análisis de las fracciones por CLAP.

3.2.5. Cromatografía de gases.

En los cromatogramas correspondientes al análisis de ésteres de ácidos carboxílicos, se observan de uno a tres picos según el precipitado analizado. Estos aparecen en tiempos de retención, similares a los de ácidos dicarboxílicos con seis átomos de carbono, o bien tricarboxílicos con cinco átomos de carbono.

La identificación tentativa de estos compuestos se hizo con base en sus tiempos de retención, que coinciden con los del ácido málico y ácido carboxisuccínico. Sin embargo, para su identificación definitiva,

se requiere del espectro de masas correspondiente. En la Fig. 9 se presenta un cromatograma de una de las muestras analizadas por esta técnica.



1. Màlico; 2. Carboxisuccínico; 3. No ident.

Fig. 9. Cromatograma realizado por cromatografía de gases.

Cabe señalar que durante el proceso de esterificación, se desprendió olor a ácido sulfhídrico o a algún tiol.

Un resumen de los productos identificados en el sistema formado por tiocianato de amonio, formaldehído, cloruro de amonio, ácido acético y agua, se muestra en la Tabla VI.

TABLA VI
PRODUCTOS IDENTIFICADOS EN LA MEZCLA REACTIVA FORMADA POR NH_4SCN, FORMALDEHIDO, CLORURO DE AMONIO, ACIDO ACETICO Y AGUA.

Compuesto	*Clase*	*Forma de identificación*
Glicina	*Aminoácido*	*CLAP, C.C.F., Electroforesis*
Alanina	*Aminoácido*	*CLAP*
β – AIBA	*Aminoácido*	*CLAP*
Metionina	*Aminoácido*	*CLAP*
Cisteína	*Aminoácido*	*CLAP*
Ac. isopertiociánico	*Heterociclo*	*I.R.*
Ac. isoditiociánico	*Heterociclo*	*I.R.*
Ac. málico	*Ac. carboxílico*	*C.G.*
Ac. carboxisuccínico	*Ac. carboxílico*	*C.G.*
Ac. sulfhídrico	*Ac. inorgánico*	*Pruebas químicas*

Otros compuestos que posiblemente llegaron a formarse, pero que no han sido detectados, son la cianhidrina del formaldehído, el sulfuro de carbonilo (COS), la tiourea, el ácido tiocarbámico, el sulfuro de amonio y tiocarbamato de amonio. Entre las causas por las que no se detectaron se encuentran su baja estabilidad y su reactividad para formar otros compuestos poliméricos.

CAPITULO IV

DISCUSION DE RESULTADOS

En las pasadas décadas se ha demostrado que una gran variedad de compuestos biológicos, puede formarse a partir de gases de composición química muy simple, y que asemejan la atmósfera primitiva. También a partir de compuestos simples y que han sido detectados en el espacio interestelar, en cometas, o bien en experimentos simulados, se han obtenido constituyentes importantes para las células. Aunque entre los compuestos sintetizados, los aminoácidos han sido de los más abundantes, la formación abiótica de aminoácidos azufrados presenta problemas, bajo las condiciones de la Tierra Primitva.

La materia prima principal para nuestros estudios fue el tiocianato de amonio, que se sabe se produce en manantiales geotermales (Muhkin, 1974; Dowler e Ingmanson, 1979), y se ha detectado en el material interestelar (Irvine et. al., 1987). Otro compuesto importante en la mezcla de reacción es el formaldehído, que es un componente muy abundante en los cometas y que también ha sido detectado en el espacio interestelar.

4.1. Formación de aminoácidos.

Las reacciones entre el tiocianato de amonio y el formaldehído, en presencia de cloruro de amonio, originan un gran número de productos, dada la gran reactividad que presenta el tiocianato de amonio. Entre estos productos destaca la formación de aminoácidos azufrados.

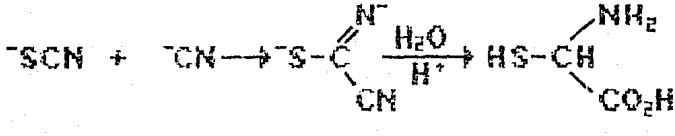
Como se mencionó anteriormente, existe un gran problema en la síntesis de aminoácidos azufrados, que se han tratado de sintetizar

partiendo de diferentes rutas: de una mezcla de ácido sulfhídrico y varias combinaciones de nitrógeno y carbono expuestas a descargas eléctricas, sin embargo, el rendimiento obtenido fue aproximadamente de 2 % (Bhadra y Ponnamperuma, 1986); por la irradiación UV de una solución acuosa 0.1 M de tiocianato de amonio, se obtuvo un rendimiento menor al 1 % (Steinman et. al., 1968).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran la formación de aminoácidos con un rendimiento del 2 % (similar al de Bhadra y Ponnamperuma); que aunque es superior al de otros estudios enfocados al problema de los aminoácidos azufrados, aún sigue siendo muy bajo. El mecanismo de formación de aminoácidos es muy complejo, y principalmente deriva de la formación de HCN en la descomposición hidrolítica que sufre el tiocianato de amonio para producir compuestos heterocíclicos, como en el siguiente ejemplo:

$$RCHO \xrightarrow{NH_3,\ HCN} RCH(NH_2)CN \xrightarrow{H_2O} RCH(NH_2)CO_2H$$

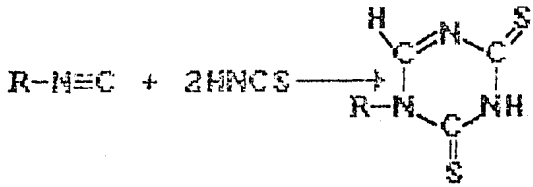
Algunos de los aminoácidos obtenidos son de naturaleza no proteínica, y probablemente correspondan a ciertos picos no identificados en el cromatograma resultante del análisis por CLAP. Por ejemplo, un aminoácido posible sería la tioglicina.



A pesar de que en la presente investigación, se lograron obtener diversos aminoácidos (proteínicos y no proteínicos), algunos de ellos con azufre, no existe aún un mecanismo de síntesis abiótica de aminoácidos azufrados con rendimientos lo suficientemente elevados, como para poder explicar su origen y permanencia en la Tierra Primitiva.

4.2. Potencialidad del NH_4SCN en la síntesis de heterociclos.

Un hecho importante que cabe destacar es la gran potencialidad que presenta el ión tiocianato en las síntesis químicas, y que por ello es capaz de originar una gran variedad de compuestos que pueden ser intermediarios muy útiles en la síntesis de gran número de heterociclos, tales como imidazoles, purinas, tiazoles y pirimidinas (Gompper et. al., 1966). También es posible obtener triazinas al combinar ácido isotiociánico con un isonitrilo (Ugi et. al., 1965).

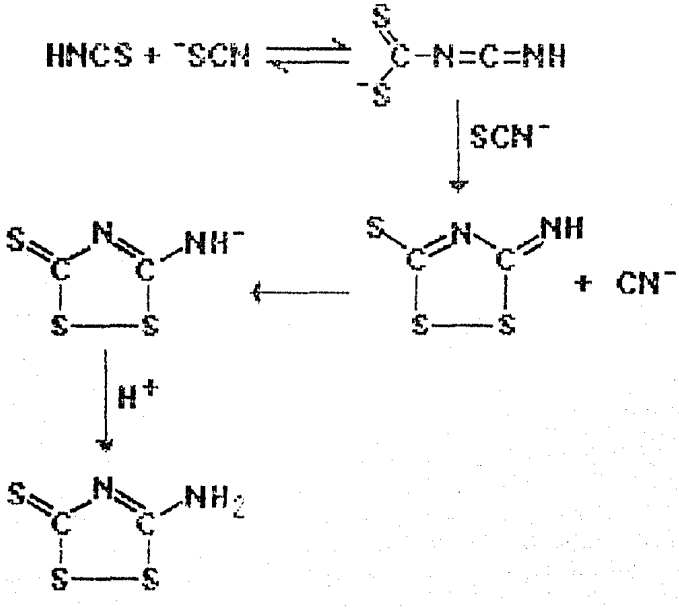


El tiocianato de amonio en solución participa en el siguiente equilibrio:

$$NH_4SCN \rightleftharpoons NH_3 + HSCN$$

y a su vez, el ácido tiociánico está en equilibrio con su forma tautomérica, el HNCS, que tanto en estado gaseoso, como en soluciones acuosas y no acuosas, predomina sobre el ácido tiociánico. El ácido isotiociánico se encuentra principalmente en su forma no disociada, y en solución se

polimeriza rápidamente:



El ácido isopertiociánico se forma también con sólo mezclar tiocianato de amonio y formaldehído, reacción prácticamente espontánea, por lo que dicho heterociclo resultó ser el más abundante en nuestros experimentos. La fácil formación de este compuesto, nos permite predecir que estas reacciones también pueden llevarse a cabo en el espacio interestelar (y por tanto en cometas), donde como se mencionó anteriormente, ya se han detectado al ácido isotiociánico y al formaldehído.

4.3. Otras reacciones probables en el sistema reactivo constituído por NH_4SCN, formaldehído, cloruro de amonio, ácido acético y agua.

Una reacción importante que posiblemente se lleva a cabo en este sistema, es la isomerización del tiocianato en tiourea:

$$NH_4SCN \rightleftharpoons H_2NCS - NH_2$$

Esta reacción también puede producirse a través de una adición de amoníaco al enlace CN, en el ácido isotiociánico:

$$H - N = C = S \ + \ NH_3 \longrightarrow H_2NCS - NH_2$$

La tiourea, al igual que el HNCS, es uno de los compuestos químicos azufrados que se han detectado en el espacio interestelar (Irvine et., al., 1987), por lo que las reacciones anteriores pudiesen ser una de las fuentes de formación de la tiourea.

Las reacciones de hidrólisis originan varios compuestos, algunos de ellos con vidas medias muy cortas que sufren descomposiciones posteriores:

$$SCN^- \xrightarrow{H^+, H_2O} O = C = S \longrightarrow H_2S + CO_2 + NH_3$$

$$O = C = S \xrightarrow{NH_3} \underset{\underset{NH_2}{|}}{O = C - SH} \longrightarrow \underset{\underset{NH_2}{|}}{O = C - S - NH_4^+}$$

Acido tiocarbámico (inestable) — Tiocarbamato de amonio

Así, la poca estabilidad en solución de estos compuestos y su gran reactividad no hizo posible su detección en el laboratorio.

Otras reacciones probables, ocurrirían por la interacción entre el tiocianato y los mismos productos de su descomposición; tal es el caso del ácido sulfhídrico:

$$SCN^- \xrightarrow{H_2S} {}^-S - \underset{\underset{S}{\|}}{C} - NH_2$$

Ditiocarbamida
de amonio

CAPITULO V

CONSIDERACIONES FINALES

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio, nos permite hacer las siguientes observaciones.

1. El tiocianato de amonio es una materia prima importante en estudios de evolución química, ya que por su reactividad origina un gran número de compuestos orgánicos.

2. Por las reacciones de adición del tiocianato con el HCN, o bien por su descomposición originándolo, permiten ser una forma natural de concentrar HCN y de liberarlo por hidrólisis, sirviendo asi como su reservorio. A su vez, el ácido cianhídrico, es una molécula clave en la evolución química y origina una gran cantidad de compuestos de importancia biológica.

3. Entre los productos detectados en los experimentos llevados a cabo en este trabajo, se tienen aminoácidos azufrados, sin embargo, el bajo rendimiento de su formación, (2%) aunque es superior al de otros experimentos similares (1%), no resuelve el problema para esta clase de compuestos a menos de que se proponga, que aunque el grado de síntesis fue bajo, estos se fueron acumulando a lo largo del tiempo. Esta premisa estaría condicionada a los estudios cinéticos de estabilidad para los aminoácidos azufrados.

4. En todos los casos, los productos de reacción fueron los mismos, independientemente de la fuente de energía utilizada.

5. Destacar la gran visión que tuvo Alfonso L. Herrera en la elección de las materias primas (tiocianato de amonio y formaldehído) para sus estudios, y que fueron la base para este trabajo, recordando que en su época no se conocía la presencia de estos compuestos en el espacio interestelar.

6. Es importante aclarar, que las concentraciones que se manejaron en este trabajo, no corresponden a las concentraciones que se supone existieron en la Tierra Primigenia. Sin embargo, representan un primer paso en la síntesis abiótica de aminoácidos azufrados y de heterociclos.

APENDICE

1. REVELADORES

a) Ferricianuro de Potasio - Cloruro Férrico:
Para compuestos con propiedades reductoras, fenoles, aminas, tiosulfatos e isotiocianatos.

Solución A: solución acuosa de ferricianuro de potasio al 1 % .
Solución B: solución acuosa de cloruro férrico al 2 % .

Revelador: mezclar cantidades iguales de A y B un poco antes de su uso.

Tratamiento para después del rocío: los colores se intensifican con rociadas subsecuentes de HCl 2N (Stahl, 1969, p. 876).

b) Iodo:
Revelador Universal.

El cromatograma se introduce en un recipiente cerrado, en el fondo del cual se ponen unos cristales de iodo. Los vapores de iodo se generan más rápido si se calienta ligeramente el vaso.

Otra forma es poner la placa en una atmósfera densa de vapor de iodo durante cinco minutos o rociarla con una solución de iodo al 5 % en cloroformo. El exceso de iodo se evapora con aire (Stahl, 1969, p. 882).

También se pueden poner unos cristales de iodo dentro de un matraz, al cual se le introduce aire por un lado, y por otro lado se coloca una

pipeta Pasteur, con ayuda de la cual, se rocía la placa con los vapores de iodo.

c) Azida de iodo:
Para aminoácidos que contengan azufre, sulfuros y penicilina.
Solución de Azida de Iodo.

Revelador: Se prepara una solución "fresca" con tres gramos de azida de sodio en 100 ml. de iodo 0.1 N (¡Cuidado!, la azida de sodio sólida es explosiva) (Stahl, 1969. p. 882).

2. PRUEBAS QUIMICAS ESPECIFICAS

2.1. PRUEBA PARA DETECTAR FORMALDEHIDO CON ACIDO CROMOTROPICO

A un ml. de la solución problema se le agrega un ml. de H_2SO_4 concentrado y una pequeña cantidad de ácido cromotrópico sólido. Se calienta durante 10 minutos en un baño de agua caliente. El color violeta es una prueba positiva de la presencia de formaldehído.

Límite de identificación: 0.14 μg. de formaldehído. (Welcher, 1963, p. 1632; Feigl, 1983, p. 434 - 435).

2.2. PRUEBA PARA DETECTAR GLICINA MEDIANTE SU CONVERSION A ACIDO GLICOLICO

En un tubo de ensayo, se mezclan una gota de la solución problema, una gota de una solución al 1 % de nitrito de sodio y una gota de HCl concentrado. Se calienta lentamente hasta que hierva y se evapore,

entre los 105 - 110 ° C. El residuo se enfría y se le agregan tres gotas de un reactivo* recién preparado. La mezcla se calienta en un baño de agua hirviendo, durante cinco o diez minutos. Un color violeta indica la presencia de glicina.

Reactivo*: A un poco de H_2SO_4 concentrado se le agrega ácido cromotrópico, se calienta ligeramente y se centrifuga. Se utiliza el líquido sobrenadante.

Límite de identificación: 10 μg. de glicina (Feigl, 1983. p. 500 - 501).

2.3. PRUEBA PARA DETECTAR GLICINA MEDIANTE SU DEGRADACION A FORMALDEHIDO

Se mezclan una gota de la solución problema y una gota de una solución acuosa al 5 % de cloramina T recién preparada, la mezcla se calienta de tres a cinco minutos en un baño de agua caliente. Después de enfriarse, se agregan cinco gotas de H_2SO_4 concentrado y una pequeña cantidad de ácido cromotrópico. Una respuesta positiva la indica un color violeta, que puede aparecer inmediatamente o bien después de calentar un corto tiempo, en un baño de agua caliente.

Límite de identificación: 3 μg. de glicina (Feigl, 1983. p. 501).

2.4. PRUEBA DE LA NINHIDRINA PARA LA DETECCION DE ALFA Y BETA AMINOACIDOS

La solución de ninhidrina se hace con 0.2 g. de ésta en 50 ml. de

agua destilada.

Se toma un ml. de la solución de ninhidrina y se mezcla con un ml. de la solución problema, se calienta en un baño de agua caliente durante cinco minutos. El color violeta es una prueba positiva (Shriner, et. al., 1966. p. 286).

REFERENCIAS

Abelson, P.H. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55, 1365.

Beltrán, E. (1968) en Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, Tomo XXIX 37-91.

Beltrán, E. (1983) en Lazcano-Araujo, A. y Barrera, A. (editores) El Origen de la Vida, U.N.A.M., México. 49-60.

Bhadra, A. y Ponnamperuma, C. (1986) Origins of Life. 16, 286.

Broughton, J.H. y Keller, R.N. (1966) J. Inorg. Nucl. Chem. 28, 2851.

Chew, M.Y. y Boey, C.G. (1972). Phytochemistry. 11, 167-169.

Choughuley, A.S.U. y Lemmon, R.M. (1966) Nature. 210, 628.

Dowler, M.J. e Ingmanson, D.E. (1979) Nature. 279, 51-52.

Draganić, I.G. y Draganić, Z.D. (1971) The radiation chemistry of water. Academic Press, New York and London. 203-217.

Draganić, I.G. y Draganić, Z.D. (1978) en Archundia, C. (editor) Conferencias Plenarias. II Simposio sobre química nuclear, radioquímica y química de radiaciones. Publicación C.E.N.-U.N..A.M. Serie química 2-79, México. 52.

Draganić, Z.D., Draganić, I.G., Azamar, J.A., Vujošević, S.I., Berber, M.D. y Negrón-Mendoza, A. (1985) J. Mol. Evol. 21, 356-363.

Ernst, W.G. (1983) en Schopf, J.W. Earth's earliest biosphere. It's origin and evolution. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 41-52.

Feigl, F. (1983) Spot tests in organic analysis. Elsevier Science Publishing Company, Inc., Amsterdam. 434-436, 500-502.

Ferris, J.P. (1987) en The Planetary Report. 7, 10-11, 28.

Ferris, J.P. y Usher, D.A. (1983) en Zubay, G. (editor) cap. XXXII Biochemistry. Adisson Westley, Reading, Mass. 1194-1198.

Fox, S.W. y Dose, K. (1977) Molecular evolution and the origin of life. Marcel Dekker, Inc., New York.

Gautier, A.M. (1901) Compt. Rend. 132, 932-938.

Gautier, A.M. (1910) Compt. Rend. 150, 1564-1569.

Getoff, N. y Schenck, O. (1982) Radiation Chemistry I 337-343.

Gibson, E.K., Carr, L.P., Gilmour, I. y Pillinger, C.T. (1986) Origins of Life. 16, 199-200.

Gompper, R., Gang, M. y Saygin, F. (1966) Tetrahedron Lett. 1885.

Grafton, D.Ch., Rabinowitz, J.L. (1967) Principles of radioisotope methodology. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 3rd. ed. 369.

Haldane, J.B.S. (1929) en Bernal, J.D. (1967) The origin of life. World Publ. Co., Cleveland 242-249.

Handbook of chemistry and physics (1987-1988) Weast, R.C. (editor) CRC Press Inc., Florida 68th. ed.

Harada, K., Takasaki, M., Igari, S. y Shimoyama, A. (1986) Origins of Life. 16, 274.

Hartman, H., Lawless, J.G. y Morrison, P., editores (1985) Search for the universal ancestors. NASA, Washington, D.C. 23-73.

Herrera, A.L. Cuadernos de trabajo 1931-1932, 1932-1933 y 1933-1934.

Herrera, A.L. (1932 a) Bulletin du laboratoire de plasmogénie, Tomo I, número 4 p.p. 7-8.

Herrera, A.L. (1932 b) Bulletin du laboratoire de plasmogénie, Tomo I, número 5 p.p. 9-10.

Herrera, A.L. (1932 c) Bulletin du laboratoire de plasmogénie, Tomo I, número 7 p.p. 13-14.

Herrera, A.L. (1932 d) Bulletin du laboratoire de plasmogénie, Tomo I, número 9 p.p. 17-18.

Herrera, A.L. (1933) Bulletin du laboratoire de plasmogénie, Tomo I, número 12 p.p. 23-24.

Herrera, A.L. (1942) Science. 96, 14.

Heyns, V.K., Walter, W. y Meyer, E. (1957) Die Naturwissenschaften 44, 385-389.

Irvine, W.M., Goldsmith, P.F. y Hjalmarson, A. (1987) en Hollenbach, D.J. y Thronson, H.A. Jr. (editores) Interstellar Processes. D. Reidel Publishing Company, Holland 576.

Johnson, B., Hill, J.A. y Bailey, H.B. (1915) J. Am. Chem. Soc. 37, 2415-2416.

Klages, A. (1903) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 36, 1506-1512.

Ladrón de Guevara, O., Bolívar, F. (1985) J. Chromatogr. 349, 91-98.

Ladrón de Guevara, O., Quintero, R. y Padilla, P. (1985) J. Chromatogr. 329, 428-433.

Leakey, R.E. (1981) Charles Darwin. El origen de las especies. Martín Casillas editores, S.A.-CONACyT, México. 2a. ed. en español 11-40.

Levine, J.S. (1982) J. Mol. Evol. 18, 161-172.

Lindroth, P. y Moppen, K. (1979) Anal. Chem. 51, 1667-1674.

Ling, A.R. y Nanji, D.R. (1922) Biochem. J. 16, 702-703.

Lovelock, J.E. (1979) Gaia. A new look at life on Earth. Oxford University Press, London. Cap. V 64-83.

Miller, S.L., Urey, H.C. y Oró, J. (1976) J. Mol. Evol. 9, 59-72.

Morgan, T.D.B., Phillips, E.D. y Stedman, G. (1969) J. Chem. Soc. (A) 2318-2322.

Muhkin, L. (1974) Nature 251, 50-51.

Negrón-Mendoza, A. (1980) Formación de ácidos policarboxílicos de importancia biológica inducida por radiación ionizante. Tesis doctoral. Fac. Química, U.N.A.M.

Negrón-Mendoza, A. (1986) Rev. Ciencias, número especial 4-12.

Negrón-Mendoza, A. y Navarro-González, R. (1982) Determinación de ácidos carboxílicos por cromatografía de gases. Informe técnico Q-12-82 Departamento de Química, C.E.N., U.N.A.M.

Negrón-Mendoza, A., Navarro-González, R. y Torres, J.L. (1986) Origins of Life. 16, 305-306.

Negrón-Mendoza, A., Perezgasga, L., Padilla, P., García, L. y Ladrón de Guevara, O. (1988) III Congreso Mexicano de Química Analítica, en prensa.

Newman, A.A. (1975) Chemistry and Biochemistry of thiocyanic acid and its derivatives. Academic Press, London

Oi, S. (1973) Agric. Biol. Chem. 37, 629-635.

Olea, A. (1981) Radiólisis gamma del ácido aconítico en medio acuoso básico y su posible significado en la evolución química. Tesis de licenciatura, Fac. Ciencias, U.N.A.M.

Oparin, A.I. (1924) en Bernal, J.D. (1967) The origin of life. World Publ. Co., Cleveland 119-234.

Oparin, A.I. (1972) en Ponnamperuma, C. (editor) Exobiology. North-Holland, Amsterdam 1-15.

Pasto, D.J. y Johnson, C.R. (1969) Organic structure determination. Prentice-Hall Inc., New Jersey 428-430.

Perezgasga, L., Aguirre, M.E. y Negrón-Mendoza, A. (1988) Dosimetría de la unidad Gammabeam 651 PT (II Parte). Informe técnico Q-01-88 Departamento de Químico, I.C.N., U.N.A.M.

Perrin, D.D., Armarego, W.L.F. y Perrin, R.D. (1980) Purification of labcratory chemicals. Pergamon Press LTD, London. 551-562.

Ramírez Reyes del Campillo, C. y Aguilar, D.C. (1982) Radiólisis del ácido succínico y del succinato de amonio bajo condiciones de la tierra primitiva. Tesis de licenciatura, Fac. Ciencias, U.N.A.M.

Río del, C. (1983) en Lazcano-Araujo, A. y Barrera, A. (editores) El origen de la vida. U.N.A.M., México 61-75.

Sadtler Research Laboratories (1986) Ultra violet spectra division of Bio-rad laboratories, Philadelphia.

Schiewelbein, H., Baumeister, R. y Vogel, R. (1969) Naturwissenschaften. 56, 416-417.

Schopf, J.W. y Walter, M.R. (1983) en Schopf, J.W. (editor) Earth's earl-

iest biosphere. It's origin and evolution. Princeton University Press, Princeton, New Jersey 214-239.

Shriner, R.L., Fuson, R.C. y Curtin, D.Y. (1966) *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*. Limusa-Wiley, S.A., México 285-288.

Sillén, L.G. (1965) Arkiv för kemi. 24, 431-456.

Siuda, A. (1982) Separación de productos radiolíticos formados en el sistema HCN 0.1 M y CH_3CN 0.1 M mediante una columna de intercambio iónico de SP-Sephadex cm-25. Informe técnico Q-02-82. Departamento de Química, C.E.N., U.N.A.M.

Smith, A.E., Silver, J.J. y Steinman, G. (1968) Experientia. 24, 36-38.

Smith, A.E., Steinman, G. y Galand, C. (1969) Experientia. 25, 255-258.

Smith, A.E, Raab, K. y Ekpoha-Mensah, J.A. (1971) Experientia. 27, 648-650.

Sörbo, B. (1975) en Greenberg, D.M. (editor) *Metabolic pathways*. Academic Press, New York. 3rd. ed., vol. 7, 433-456.

Stahl, E. (1969) *Thin layer chromatography*. Toppan Printing Co., Singapore 876, 882, 890.

Steinman, G., Smith, A.E. y Silver, J.J. (1968) Science. 159, 1108-1109.

Stevenson, D.J. (1983) en Schopf, J.W. *Earth's earliest biosphere. It's*

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

origin and evolution. Princeton University Press, Princeton, New Jersey 32-40.

Swallow, A.J. (1960) Radiation chemistry of organic compounds. Pergamon Press, New York 45-48, 243-244.

Templado, J. (1982) Historia de las teorías evolucionistas. Alhambra, Madrid 1-52.

Torres, J.L., Albarrán, G. y Archundia, C. (1981) Electroforesis con alto voltaje en papel. Construcción y habilitación de un sistema de electroforesis. Informe técnico RQ-02-81. Departamento de Química, C.E.N., U.N.A.M.

Ugi,I., Fetzer, U., Eholzer, U., Knupfer, H. y Offerman, K. (1965) Angew. Chem. Internat. Edit. 4, 472-481.

Urey, H.C. (1952) Proc. Nat. Acad. Sci., US 38, 351-363.

Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.J., Westley, J. y Wissing, F.(1981) Cyanide in biology. Academic Press, London 54-69.

Wagner, E.L. (1965) J. Chem. Phys. 43, 2728-2736.

Walker, J.G.C. (1977) Evolution of the atmosphere. Macmillan Publ. Co., N.Y.

Welcher, J.F. editor (1963) Standard methods of chemical analysis. Litton Educational Publishing, Inc. Vol. II B, U.S.A. 6th. ed. 1632.

Westley, J. (1973) Adv. Enzymol. 39, 327-368.

Yamamoto, T. y Oi, S. (1977) J. Ferment. Tech. 55, 560-569.