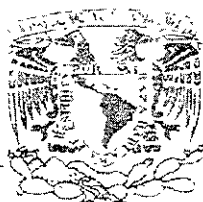


UNAM
POSGRADO



00582
10

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas

PIRÓLISIS DE AMINOÁCIDOS Y LAS BASES
NITROGENADAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y
ALGUNAS IMPLICACIONES PARA LA QUÍMICA
PREBIÓTICA

47
T E S I S

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Químicas

(Química Analítica)

p r e s e n t a:

Janna Douda

Asesor: Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko
Instituto de Ciencias Nucleares

México, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Jurado asignado según el tema:

Presidente: Dr. Armando Manjarrez Moreno
Primer Vocal: Dra. Luz Elena Vera Ávila
Segundo Vocal: Dr. Héctor Guillermo Barrios López
Tercer Vocal: Dr. Guillermo Enrique Negrón Silva
Secretario: Dra. María Guadalupe Albarrán Sánchez
Primer Suplente: Dra. Araceli Peña Álvarez
Segundo Suplente: Dra. Evangelina Camacho Frías

Sitio donde desarrolló la tesis:

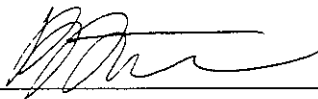
Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM

Candidato al grado:



M.en C. Janna Douda

Asesor:



Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko

Con amor y cariño a Yurko y Marco

A mis padres, hermanos y suegros por todo el apoyo

A todos mis amigos, que estaban conmigo en el bien y en el mal

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi respeto agradezco al Dr. Vladimir Basiuk que con su paciencia, confianza, dedicación y apoyo incondicional, hizo posible la realización de esta tesis. Agradezco mucho su manera amistosa de dirigir mi trabajo y de transmitir sus conocimientos.

Agradezco enormemente a Dra. Maria Guadalupe Albarrán Sánchez por su gran apoyo científico y moral, por la redacción de la tesis y sus valiosos comentarios brindados a lo largo del presente trabajo.

Agradezco a Dra. Luz Elena Vera Avila por su apoyo e interés profesional y sus valiosos comentarios sobre el trabajo presente.

A los doctores Héctor Barrios López, Raymundo Cruz Almanza y Anatoli Simirski por su gran ayuda científica y moral, así como por sus valiosos consejos y enseñanzas brindadas.

A los doctores Armando Manjarres Moreno, Guillermo Enrique Negrón Silva, Angelina Camacho Frias, Araceli Peña Álvarez y otros miembros del jurado formado, por apoyarme y ayudarme con sus valiosos consejos sobre mi trabajo.

Al profesor Francisco Rojo Callejas por las enseñanzas brindadas durante el curso de cromatografía de gases.

Al Dr. Jesús Guzmán García, Jefe de la División de Estudios de Posgrado, a la Dra. Noráh Barba Behrens, Coordinadora del programa de Maestría y Doctorado en

ciencias Químicas, al Dr. Raymundo Cea Olivares Coordinador del programa de maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, al Departamento de Control Escolar por valiosa ayuda proporcionada durante mis estudios de doctorado.

Al Instituto de Ciencias Nucleares y su director Dr. Octavio Castaños Garza por permitirme utilizar sus instalaciones (laboratorios, biblioteca, etc.), equipo y servicios para la realización de la presente investigación.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM y la Dirección de Apoyo a la Investigación de CONACYT (proyecto 25297 E) por haberme otorgado beca para la realización de estos estudios.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto de Ciencias Nucleares por su apoyo e interés personal con los que compartí las alegrías y algunos desencantos que hicieron de esta etapa de mi vida algo inolvidable.

RESUMEN

Esta tesis describe la pirólisis de algunos aminoácidos, poli-aminoácidos, purinas y pirimidinas a temperaturas entre 400°C y 1000°C. Se evaluó la supervivencia de los aminoácidos, de las purinas y de las pirimidinas, así como la formación de piperazindionas en el caso de los aminoácidos. Se encontró que los aminoácidos y las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos no sobreviven a temperaturas superiores a 700°C; al mismo tiempo, ellos presentan niveles de supervivencia de 1 a 10% a temperaturas de 500 a 600°C y la producción de piperazindionas es de ese mismo orden que los aminoácidos correspondientes.

Se estudió el efecto de las atmósferas de N₂ y de CO₂ para simular diferentes condiciones de la Tierra Primitiva en los experimentos pirolíticos de los compuestos estudiados y se encontró que la diferencia entre los niveles de supervivencia de las moléculas biojógicas pirolizadas en estas atmósferas, no es muy significativa.

Se llevó a cabo la pirólisis de los aminoácidos en presencia de gel de sílice como un catalizador modelo a temperaturas entre 400°C y 1000°C y se evaluó su efecto sobre la supervivencia de los aminoácidos y la producción de las piperazindionas, demostrándose que el gel de sílice tiene un pequeño efecto catalítico en la producción de las piperazindionas en estas condiciones.

Se analizaron cualitativamente los productos poco volátiles y solubles en cloroformo, de la pirólisis de los aminoácidos valina y leucina como representantes de los aminoácidos a temperatura de 500°C en la presencia de gel de sílice. Se identificaron como principales productos las piperazindionas, amidinas bicíclicas e hidantoinas entre otros.

También se analizaron cualitativamente los productos poco volátiles y solubles en cloroformo de la pirólisis de poliglicina, polialanina y polivalina a temperatura de 500°C. Estos productos fueron separados por un cromatógrafo de gases, acoplado a un espectrómetro de infrarrojo y uno de masas para identificar cada uno de los compuestos. Los productos principales fueron: isocianato, ácidos carboxílicos, cetonas, nitrilos, amidas, aminas, hidrocarburos saturados e insaturados, pirroles, piridinas, hidantoinas y piperazindionas. La formación de las piperazindionas fue una de las rutas principales de la pirólisis.

A pesar del alto grado de descomposición de las biomoléculas estudiadas, el papel de la entrega por los cuerpos extraterrestres podría ser muy importante en el origen de la Vida, tomando en cuenta la cantidad de sedimentación del polvo interplanetario y otros cuerpos espaciales.

ABSTRACT

In this thesis the pyrolysis of some amino acids, poly-amino acids, purines and pyrimidines at temperature of 400-1000°C has been described. Both the survival of amino acids, purines and pyrimidines, and the formation of piperazinediones in the case of amino acids have been evaluated. It has been found that most of the compounds studied cannot survive the temperatures substantially higher than 700°C; however at 500-600°C, the recovery can be at a per cent or 10% level. The production of piperazinediones is of comparable levels as the survival of the corresponding amino acids.

Comparison of the results of pyrolytic experiments under the atmosphere of CO₂ and N₂ (both of them are used to simulate different conditions in the primitive Earth) gave no remarkable differences in the survival of the compounds studied.

The pyrolysis of the amino acids in the presence of silica gel as a model catalyst has been carried out at 400-1000°C, and its catalytic effect on the amino acids survival and the production of piperazinediones has been evaluated. It has been shown that silica gel has a little catalytic effect on the production of piperazinediones under the applied conditions.

Less volatile and chloroform soluble products of pyrolysis of the representing amino acids, valine and leucine, at 500°C in the presence of silica gel have been analyzed qualitatively. Piperazinediones, bicyclic amidines and hydantoines have been identified as principal products

Besides, less volatile and chloroform soluble pyrolysis products of the poli-glicine, poli-alanine and poli-valine at the same temperature have been analyzed. All these products have been separated by the gas chromatography coupled with infrared spectroscopy and mass spectrometry. In this way, the spectra have been obtained and analysed. The principal products were: an isocyanate, carboxylic acids, ketones, nitriles, amides, amines, saturated and insaturated hidrocarbons, pyrroles, pyridines, hydantoines y piperazindiones. One of the principal pyrolytic pathways is the formation of piperazinediones.

Despite the high degree of decomposition of the biomolecules studied, the role of extraterrestrial delivery by extraterrestrial bodies could have been very important for the origins of Life, if to take into account high rates of sedimentation of interplanetary dust and other space bodies.

os principales resultados de esta tesis han sido reportados en los artículos:

Basiuk V.A., Douda J. and Navarro-Gonzalez R. *Transport of extraterrestrial biomolecules to the Earth: problem of thermal stability*, Adv. Space Res., 24 (1999) 505-514.

Basiuk V.A. and Douda, J. *Pyrolysis of simple amino acids and nucleobases: survivability limits and application for extraterrestrial delivery*, Planet. Space Sci., 47 (1999) 577-584.

Douda J., Basiuk V.A. *Pyrolysis of amino acids: recovery of starting materials and yields of condensation products*, J. Anal. Appl. Pyrol. 56 (2000) 113-121.

Basiuk V.A. and Douda J. *Pyrolysis of poly-glycine and poly-L-alanine: analysis of less-volatile products by gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy/mass spectrometry*, J. Anal. Appl. Pyrol., 56 (2000) 235-246.

Basiuk V.A. and Douda J. *Analysis of less-volatile products of poly-L-valine pyrolysis by gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy/mass spectrometry*, J. Anal. Appl. Pyrol., 60 (2001) 27-40.

Basiuk V.A. and Douda J. *Survivability of biomolecules during extraterrestrial delivery: new results on pyrolysis of amino acids and poly-amino acids*, Adv. Space Res., 27 (2001) 231-236.

presentados en los siguientes congresos:

Basiuk V.A. and Douda J. *Pyrolysis of biomolecules delivered to the earth by space bodies*, ISSOL'99: 12th Int. Conf. on the Origins of Life and 9th ISSOL Meeting, San Diego, California, USA, July 11-16, 1999. Abs. pap., p 103.

Basiuk V.A. and Douda J. *Survivability of small biomolecules during extraterrestrial delivery: simulation experiments on amino acid pyrolysis*, 31st Lunar and Planetary Science Conference, March 13-17, 2000, Houston, TX, U.S.A.; Lunar and Planetary Institute, Houston (CD-ROM), Abs. # 1007.

Basiuk V.A. and Douda J. *Survivability of amino acids during extraterrestrial delivery. Results of pyrolytic experiments*/ 1st Astrobiology Science Conference, April 3-5, 2000, Mountain View, CA, U.S.A. Abs. pap., p. 119.

Basiuk V.A. and Douda J. *Survivability of biomolecules during extraterrestrial delivery. New results on pyrolysis of amino acids and poly-amino acids*/ The 33rd COSPAR Scientific Assembly, July 16-23, 2000, Warsaw, Poland, Abstracts CD-ROM.

INDICE

1. ANTECEDENTES	<u>11</u>
1.1. Técnicas experimentales de pirólisis y cromatografía	<u>11</u>
1.1.1. Pirólisis/Cromatografía de gases (Pi-CG)	<u>12</u>
1.1.2. Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (CG-EM)	<u>13</u>
1.1.3. Cromatografía de gases/Espectroscopía de infrarrojo (GC-EITF)	<u>14</u>
1.1.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	<u>15</u>
1.2. Experimentos de la pirólisis de las moléculas biológicas	<u>17</u>
1.2.1. Pirólisis de aminoácidos	<u>17</u>
1.2.2. Pirólisis de dipéptidos	<u>23</u>
1.2.3. Pirólisis de oligopéptidos	<u>26</u>
1.2.4. Pirólisis de polipéptidos	<u>27</u>
1.2.5. Pirólisis de ácidos nucleicos	<u>30</u>
1.3. Implicaciones de la pirólisis de biomoléculas para el origen de la vida	<u>30</u>
2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	<u>35</u>
3. OBJETIVOS	<u>37</u>
4. MATERIALES Y MÉTODOS	<u>38</u>
4.1. Equipos y accesorios	<u>38</u>
4.2. Disolventes y reactivos	<u>40</u>
4.2.1. Disolventes y reactivos	<u>40</u>
4.2.2. Preparación de las soluciones estándar	<u>41</u>
4.3. Procedimientos de pirólisis	<u>41</u>
4.3.1. Procedimiento para la pirólisis de los aminoácidos y las bases de los ácidos nucleicos	<u>41</u>
4.3.2. Procedimiento para la pirólisis de los aminoácidos valina y leucina en presencia de silicagel	<u>42</u>

4.3.3. Procedimiento para la pirólisis de poli-aminoácidos	<u>42</u>
4.3.4. Preparación de las muestras del condensado	<u>42</u>
4.3.5. Condiciones cromatográficas (HPLC)	<u>43</u>
4.3.6. Condiciones experimentales (CG/EITF/EM)	<u>43</u>
4.3.7. Análisis cuantitativo y tratamiento estadístico de los resultados	<u>45</u>
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	<u>50</u>
5.1. Secuencia de análisis del sublimado y de identificación	<u>50</u>
5.1.1. Optimización de la recuperación de muestra	<u>51</u>
5.1.2. Optimización de condiciones para HPLC	<u>53</u>
5.1.3. Condiciones para CG/EITF/EM	<u>54</u>
5.2. Pirólisis de aminoácidos	<u>61</u>
5.2.1. Recuperación de los aminoácidos	<u>61</u>
5.2.2. Producción de dicetopiperazinas	<u>62</u>
5.2.3. Influencia de la atmósfera en los resultados de la pirólisis	<u>65</u>
5.3. Pirólisis de las bases de ácidos nucleicos	<u>65</u>
5.4. Recuperación de la valina, leucina y sus dicetopiperazinas en presencia de silicagel y la identificación de los productos obtenidos por CG/EITF/EM	<u>67</u>
5.4.1. Recuperación de la valina, leucina y sus PDs en presencia de silicagel	<u>67</u>
5.4.2. La identificación de los productos de pirólisis de la valina en presencia de silicagel por CG/EITF/EM	<u>68</u>
5.4.3. La identificación de los productos de pirólisis de la leucina en presencia de silicagel por CG/EITF/EM	<u>77</u>
5.5. Pirólisis de poliaminoácidos	<u>85</u>
5.5.1. Productos de pirólisis de la poli-glicina	<u>85</u>
5.5.2. Productos de pirólisis de la poli-alanina	<u>88</u>
5.5.3. Productos de pirólisis de la poli-valina	<u>91</u>
6. CONCLUSIONES	<u>100</u>

7.	APENDICES	<u>103</u>
7.1.	<i>Cromatogramas de los productos de pirólisis de algunos aminoácidos y bases de los ácidos nucleicos a temperatura de 500 °C</i>	<u>103</u>
7.2.	<i>Resultados de recuperación de algunos aminoácidos, sus PDs y las bases de ácidos nucleicos a temperaturas (T) de 400 a 1000 °C</i>	<u>108</u>
7.3.	<i>Resultados de la búsqueda de los datos en las bibliotecas EPA-REVA y Wiley 138K para los compuestos selectos</i>	<u>113</u>
7.4.	<i>Espectros de masas e infrarrojo de los compuestos formados por la pirólisis de la valina y leucina en presencia de silicagel</i>	<u>121</u>
	7.4.1. <i>Los espectros de infrarrojo de los productos de pirólisis de la valina en presencia de silicagel</i>	<u>121</u>
	7.4.2. <i>Los espectros de infrarrojo de los productos de pirólisis de la leucina en presencia de silicagel</i>	<u>123</u>
	7.4.3. <i>Los espectros de masas de los productos de pirólisis de la valina en presencia de silicagel</i>	<u>126</u>
	7.4.1. <i>Los espectros de masas de los productos de pirólisis de la leucina en presencia de silicagel</i>	<u>128</u>
7.5.	<i>Espectros de masas e infrarrojo de los compuestos formados por la pirólisis de poli-glicina, poli-alanina y poli-valina</i>	<u>131</u>
	7.5.1. <i>Los espectros de masas e infrarrojo de los productos de pirólisis de la poli-glicina</i>	<u>131</u>
	7.5.2. <i>Los espectros de masas e infrarrojo de los productos de pirólisis de la poli-alanina</i>	<u>132</u>
	7.5.3. <i>Los espectros de masas e infrarrojo de los productos de pirólisis de la poli-valina</i>	<u>134</u>
8.	REFERENCIAS	<u>138-151</u>

1. ANTECEDENTES

1.1. *Técnicas experimentales de pirólisis y cromatografía*

Existen diferentes métodos físicos y químicos para la degradación de polímeros orgánicos tales como la hidrólisis, oxidación, reducción, fotólisis, pirólisis y radiólisis, los cuales se emplean para producir los productos de la degradación que una vez analizados proporcionan información acerca del polímero original. La pirólisis analítica (Pi) se considera el método de mayor influencia en el análisis de muchos compuestos de este tipo, debido a que puede acoplarse con otras técnicas de análisis como la cromatografía de gases (CG), las espectroscopías de infrarrojo (EI) y espectrometría de masas (EM). Estos sistemas integrados permiten una identificación rápida, segura y eficiente de los productos.

La pirólisis convierte a la muestra en otra sustancia o sustancias por medio de temperaturas altas. Este proceso generalmente produce moléculas con peso molecular más bajo hasta su descomposición completa, sin embargo, también pueden resultar productos con peso molecular más elevado, debido a las reacciones intermoleculares. Los perfiles pirólíticos son característicos de una muestra particular, que resultan de la aparición de los productos específicos o de la distribución relativa de los productos. La pirólisis analítica es un método que se utiliza para caracterizar una muestra original por medio de sus productos pirólíticos.

La distribución de los productos de la pirólisis depende de la presión, la temperatura y tiempo de exposición a la temperatura. Los aspectos teóricos de la pirólisis de polímeros se basan en un mecanismo de reacción por radicales libres.

Según el método de calefacción, los aparatos pirólíticos se clasifican en dos grupos: (1) con energía continua y (2) con energía pulsada. Los equipos del primer grupo son los hornos o microreactores y se calientan mediante una resistencia eléctrica y a los del segundo grupo se utilizan aparatos de filamento mediante el calentamiento inducido de un metal ferromagnético con la aplicación de radiofrecuencias ("Curie point pyrolyzers"), pirólisis por medio de láser, descargas eléctricas e inducción por radiación.

La pirólisis instantánea ("Curie point pyrolysis") evita las reacciones secundarias y da lugar a productos diferentes a aquellos producidos en la pirólisis lenta. Esto genera diferencias en los resultados de los productos pirólíticos.

La variabilidad de los resultados es debida también a otros factores tales como: las diferencias entre las formas y tamaño de la muestra, las técnicas acopladas y sus detectores durante el análisis, etc., que influyen en la distribución de los productos pirolíticos.

Por la manera de analizar los productos, las técnicas de la pirólisis se clasifican en pirólisis "en línea" y "fuera de línea" En el primer caso el pirolizador está acoplado directamente a un cromatógrafo y/o a otros equipos de análisis y en el segundo caso, el pirolizador está separado de los aparatos analíticos.

Se utiliza también la técnica de la pirólisis por pasos (Levi et al.,1970) para la determinación de los residuos orgánicos en las matrices inorgánicas. La columna cromatográfica se mantiene a temperatura subambiental (-60°C) y la muestra se calienta desde temperaturas ambiente, hasta 150, 300, 460 y 480 °C durante 5-10 min. La técnica asegura que los productos volátiles se detecten correctamente.

1.1.1. Pirólisis/Cromatografía de gases (Pi-CG)

El pirolizador puede acoplarse a un cromatógrafo de gases para llevar a cabo la separación e identificación de los productos de la pirólisis instantánea. El gas acarreador empleado en un cromatógrafo pasa por el pirolizador y lleva los productos de la pirólisis en la pre-columna y luego a la columna cromatográfica. Los pirolizadores que se acoplan al cromatógrafo de gases permiten controlar la temperatura de la pirólisis y controlar el tiempo de la reacción (tipo horno).

Las columnas capilares para la cromatografía de gases que se usan para este análisis (Irvin, 1982) son OV-17 (poli-fenilmetilsiloxano) y Carbowax 20M (polietilen glicol) principalmente.

La mayoría de las fases estacionarias de las series Chromosorb 100 y Porapaks (Q, QS) pueden operarse a temperaturas de 300°C. Otros, como Tenax (2,6-difenil-p-fenilen óxido) son estables hasta 375°C. También se pueden utilizar las fases Porasil, Spherosil, Carbowax 20M y Carbopak, de las series HP y Ultra, etc.

En la optimización del análisis influye la naturaleza del gas acarreador, la mayoría de las aplicaciones de Pi-CG describen el uso de nitrógeno como el gas acarreador y el helio se escoge para Pi-CG-EM. La naturaleza del gas acarreador puede influir en la distribución de los productos. Si se utiliza nitrógeno como gas acarreador, se identifican productos de menor peso molecular que si se utiliza hidrógeno, ya que éste tiene un efecto reductor (pirólisis por hidrogenación) Una eficiente separación de productos pirolíticos requiere una programación de temperatura.

El análisis del cromatograma nos permite conocer el número de productos y si comparamos los tiempos de retención con estándares podemos identificar de que productos se trata. Las técnicas de infrarrojo y espectrometría de masas nos dan una información respecto a la estructura de los compuestos.

Lo anterior no significa que la cromatografía carezca de importantes aplicaciones cualitativas. Por ejemplo, mediante un cromatograma se pueden detectar en un hidrolizado de proteína 30 o más aminoácidos. No obstante, la confirmación de la identidad requiere la investigación química o espectral de los componentes aislados. Al mismo tiempo, una investigación espectroscópica sería normalmente imposible sobre una mezcla tan compleja como la anterior, sin una separación cromatográfica previa. Por lo tanto, la cromatografía es con frecuencia una etapa vital en los análisis espectroscópicos cualitativos.

Es importante considerar que, aunque los cromatogramas no conducen a una identificación positiva de las especies presentes en una muestra, proporcionan a menudo la evidencia segura de la ausencia de ciertos compuestos. Así, si en la muestra no aparece un pico con el mismo tiempo de retención que el estándar en las mismas condiciones, se puede asumir que el compuesto en cuestión está ausente (o tiene una concentración por debajo del límite de detección del procedimiento).

La transferencia ineficiente de los productos del pirolizador hasta la columna cromatográfica puede conducir a variaciones significativas en los productos de distribución. En caso de los compuestos simples puede ser adecuada la comparación de los tiempos de retención con los compuestos estándar, pero para muestras más complejas esto no es fácilmente aplicable. Además, los tiempos de retención pueden ser iguales, pero las estructuras no. Finalmente, la identificación de los productos puede ser más segura cuando se apliquen las técnicas espectroscópicas.

1 1.2. Cromatografía de gases/Espectrometría de masas (CG-EM)

La mayoría de los espectrómetros de masas de sector magnético y de cuadrupolo se suministran con los accesorios necesarios para acoplarlos a un equipo de cromatografía de gases. Cuando se dispone de los compuestos de referencia, la identificación final se basa en una comparación de los espectros de masas del analito con los espectros de las muestras patrón de los compuestos esperados. El procedimiento se basa en suponer que (1) los modelos de fragmentación son únicos y (2) que las condiciones experimentales se pueden controlar de tal manera que los espectros sean reproducibles. La probabilidad que tienen compuestos diferentes de dar el mismo espectro se hace

cada vez menor a medida que aumentan los picos espectrales. Por esa razón, la ionización por impacto de electrones es el método elegido para comparar los espectros de los compuestos.

De los espectros de masas de los productos formados por la pirólisis, la primera información que puede conocerse a través del pico del ion molecular es su peso molecular. El pico del ion molecular permite además determinar si el compuesto contiene o no átomos de nitrógeno incorporados ya que los compuestos con relaciones de masa-carga (m/z) de número impar tienen un número impar de átomos de nitrógeno, como en el caso de los nitrilos. Relaciones de m/z pares sugieren compuestos que no contienen átomos de nitrógeno o que contienen un número par de estos átomos, por ejemplo los hidrocarburos o los piperazin-2,5-dionas (PDs), respectivamente.

Desafortunadamente, las alturas de los picos de los espectros de masas dependen en gran parte de variables tales como la energía de haz de electrones, la localización de la muestra con respecto al haz, la presión de la muestra y la temperatura. En consecuencia, se observan variaciones significantes en la abundancia relativa para espectros obtenidos en diferentes laboratorios y con diferentes instrumentos. A pesar de esto, ha sido posible en un número elevado de casos identificar analitos a partir de espectros de una biblioteca obtenidos con diversos instrumentos y condiciones de trabajo. Generalmente es deseable confirmar la identidad de un compuesto por comparación de su espectro con el espectro de un compuesto auténtico obtenido con el mismo instrumento y bajo las mismas condiciones.

Los pirolizadores se pueden acoplar directamente con los espectrómetros de masas (Pi-EM) para la producción de pirogramas de masa de identificación.

1.1.3. Cromatografía de gases/Espectroscopía de infrarrojo(GC-EITF)

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier proporciona un potente medio para la separación e identificación de los componentes de mezclas complejas. Los datos espectrales se digitalizan y se almacenan en un ordenador y a partir de ellos se obtienen los espectros.

A veces se tropieza con dificultades cuando se intenta comparar los espectros correspondientes a los efluentes gaseosos de la columna con los espectros de la biblioteca que se han obtenido a partir de muestras sólidas o líquidas. Los espectros de gases contienen una estructura fina rotacional, la cual no se encuentra en los espectros de sólidos o líquidos; como resultado se observan diferencias significativas en el aspecto de los espectros. Otra diferencia entre los espectros en fase gaseosa y en

fase líquida es la ausencia en las primeras bandas debidas a interacciones intermoleculares, tales como los puentes de hidrógeno en alcoholes y en los ácidos. Como en el caso de la CG-EM, hay disponibles bibliotecas de espectros digitalizados y sistemas de búsqueda para manipular la enorme cantidad de datos, que producen los instrumentos de CG/EITF, aún con muestras relativamente simples.

1.1.4. *Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)*

Sobre la separación y el análisis cromatográfico de los aminoácidos se han publicado muchos trabajos (Irwin, 1982; Merritt et al., 1967; Mauger, 1971). Generalmente, los métodos de separación fueron diseñados tomando en cuenta las diferencias de hidrofobicidad de los compuestos y la influencia de los sustituyentes en la carga final de las estructuras *zwitteriónicas*.

Las técnicas más utilizadas para este tipo de análisis son la cromatografía de pares iónicos o la cromatografía de reparto. Los aminoácidos pueden ser separados en forma no derivatizada en las columnas de exclusión iónica, pero esto requiere de un control del pH cuidadoso, lo cual permite la elución de diferentes aminoácidos conforme al carácter catiónico de los grupos amino terminales. Las separaciones de los aminoácidos en fase reversa generalmente requieren de una derivatización pre-columna. Una alternativa es la cromatografía en la fase reversa de los aminoácidos libres con la derivatización post-columna. Esto es posible por la formación de los pares iónicos al usar las sales de alquil-sulfonatos como aditivos en la fase móvil.

Sin embargo, los aminoácidos no derivatizados también pueden ser separados con una buena resolución utilizando una columna con sílice C₈ de 100 × 4.6 mm d.i. (Chaves das Neves and Morais, 1997). En este trabajo fueron separados cromatográficamente de una mezcla 20 aminoácidos en 35 minutos. Hay que tomar en cuenta que para esta separación utilizaron gradiente de elución. El eluyente A fue una solución acuosa de ácido trifluoroacético con pH 1.97 y el eluyente B acetonitrilo (que aparece en concentración de 35% en 20 minutos del proceso cromatográfico y aumenta hasta 40% en 28 minutos). Además, se utilizó el detector Sedex 55 (evaporative light scattering detector).

La cromatografía de reparto es el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizada. Anteriormente la mayoría de aplicaciones de este método se refería a los compuestos polares no iónicos, los cuales tienen de bajo a moderado peso molecular (< 3000). Recientemente se

han desarrollado algunos métodos (derivatización y formación de pares iónicos) que permiten las separaciones de los compuestos iónicos por este mecanismo.

En cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria es no polar y con frecuencia se trata de un hidrocarburo, la fase móvil es polar como el agua, metanol o acetonitrilo. Por esa razón, los componentes más polares aparecen primero en el cromatograma. Casi las tres cuartas partes de toda la cromatografía de líquidos de alta resolución se lleva a cabo usando cromatografía de fase reversa. Por lo general, el grupo sustituido de siloxano en estos recubrimientos es una cadena C_8 (n-octilo) o una cadena C_{18} (n-octadecilo). Los grupos de hidrocarburos se alinean uno junto al otro y en forma perpendicular a la superficie de la partícula, dando una estructura semejante a un cepillo. Hasta el momento no está del todo claro el mecanismo por el cual estas superficies retienen a los solutos. Se cree que la estructura de cepillo se comporta como una fase estacionaria líquido-líquido ordinaria. Otra opinión es que en esta fase tiene lugar una adsorción física. Las moléculas de la fase móvil compiten entonces con las del analito por una posición en la superficie orgánica. Lo importante es que las cadenas más largas originan rellenos, que muestran una mayor retención. Además, una mayor longitud de la cadena permite una mayor cantidad de la muestra. Por ejemplo, para un relleno de C_{18} es casi el doble que para uno de C_4 en condiciones similares. Sin embargo, esta regla no funciona cuando el porcentaje del carbono es idéntico.

En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía en fase reversa, la elución se lleva a cabo con una fase móvil de elevada polaridad (una solución acuosa) conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. Se ha de procurar que el pH sea menor, de aproximadamente, 7.5 porque si no, puede tener lugar la hidrólisis del siloxano, lo que llevaría a la degradación de la fase estacionaria.

Una buena cromatografía con fases móviles interactivas, requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos. Las polaridades en orden creciente para varios grupos funcionales del analito son:

Hidrocarburos < éteres < ésteres < cetonas < aldehídos < amidas < aminas < alcoholes.

El agua es más polar que cualquier compuesto que contenga alguno de los grupos funcionales anteriores.

Para describir cuantitativamente la polaridad del disolvente, se han desarrollado varios índices. El más útil para la cromatografía de reparto parece ser el *índice de polaridad P'*, desarrollado por Snyder. Para mejorar la resolución cromatográfica de dos especies se puede manipular mediante el factor de capacidad k' , el cual puede a su vez modificarse, cambiando el índice de polaridad del disolvente. Es decir, para una separación en fase reversa:

$$k'_2/k'_1 = 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

donde k'_1 y k'_2 son valores inicial y final de k' para un soluto dado, P'_1 y P'_2 son los correspondientes valores de P' de la fase móvil.

Para una mezcla de disolventes A y B el índice de polaridad P'_{AB}

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B,$$

donde P'_A y P'_B son los índices de polaridad de los dos disolventes y ϕ_A y ϕ_B son las fracciones del volumen de cada uno de ellos.

En el estudio presente se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para analizar cuantitativamente las bases de los ácidos nucleicos y aminoácidos recuperados después de la pirólisis y los productos mayoritarios de la pirólisis de aminoácidos piperazin-2,5-dionas (PDs).

1.2. Experimentos de la pirólisis de las moléculas biológicas

1.2.1. Pirólisis de aminoácidos

La pirólisis de los compuestos biológicos, incluyendo los aminoácidos y las bases de ácidos nucleicos, ha sido y sigue siendo un asunto de numerosos estudios (Irwin, 1982; Meuzelaar et al., 1982). Los primeros estudios de la pirólisis de aminoácidos los realizaron Janak (1960) y Ulehla (1961). Posteriormente Winter y Albro (1964) encontraron que los fragmentos de aminas predominaban en la pirólisis de estos compuestos, pero su formación requería de un periodo de equilibrio antes del análisis de los productos pirólíticos. Esto aseguraría la ocurrencia de reacciones secundarias e incrementaría la complejidad de los pirogramas.

Estudiando la pirólisis de aminoácidos, Simmonds y Shulman informaron sobre la degradación controlada para estos compuestos usando Pi-CG-EM (Simmonds et al., 1972; Merritt et al., 1967;

Ratcliff et al., 1974). Las variaciones en la pirólisis, combinadas con la identificación de los espectros de masas de los productos, permite identificar muchos productos de pirólisis. Esto indica, que bajo la pirólisis todos los aminoácidos estudiados, con la posible excepción de la glicina, presentan reacciones similares.

Simon y Giacobbo (1965) caracterizaron 28 aminoácidos y en estudios posteriores se identificaron muchos de los productos de la pirólisis de los aminoácidos y se propusieron mecanismos para su formación (Vollmin et al., 1966; Shulman et al., 1968; Simmonds et al., 1972; Ratcliff et al., 1974; Patterson et al., 1973; Posthumus et al., 1977). Por ejemplo, la fenilalanina bajo la pirólisis produce tolueno, estireno, benceno, etilbenceno (Simon et al., 1973) y el complejo de productos minoritarios que incluye fenantreno, naftaleno, bifenilo, estilbenceno, quinolina, antraceno y fenilnaftaleno (Patterson et al., 1973). Según Winter y Albro (1964) a partir de la fenilalanina por las reacciones secundarias se obtienen amoniaco, dimetilamina, etilamina, propilamina, tripropilamina, dipropilamina, tributilamina y bencilcianida.

Ratcliff y sus colaboradores (1974) indican que los aminoácidos se descomponen a 500°C y producen CO₂, H₂O, NH₃ y CO junto con una variedad de compuestos orgánicos volátiles simples como aminas, nitrilos, amidas, hidrocarburos, etc., así como sufren la ciclodimerización intermolecular produciendo dicetopiperazinas con rendimientos de 5 a 20% (Ratcliff et al., 1974; Simmonds et al., 1972) o hasta 68% para alanina (Basiuk and Navarro-González, 1998). El último hecho es muy importante en el contexto del origen de la vida porque los residuos de aminoácidos en PDs pueden regenerar a los aminoácidos libres de nuevo bajo hidrólisis.

Para los α -aminoácidos (Ratcliff et al., 1974) la ruta pirolítica más importante es la descarboxilación con la formación de aminas. Entre otros productos (Figura 1, Tabla 1), los aldehídos formados tienen un átomo de carbono menos que la materia prima. Los productos de reacciones secundarias son N-alquilaldimidinas y nitrilos en cantidades de 8 a 12% que se producen de aldaminas sencillas, las cuales a su vez pueden ser los productos de descomposición de las dicetopiperazinas y aminas y contienen un átomo de carbono menos que los aminoácidos padres (Fig. 1, Tabla 1).

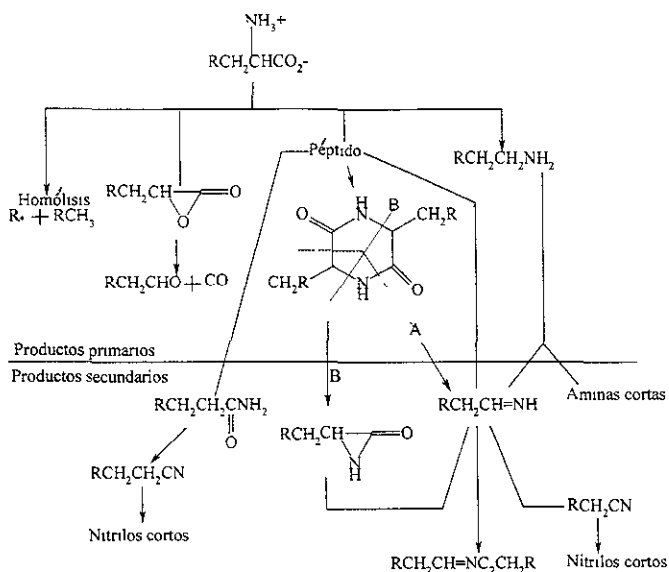


Fig. 1. Reacciones de α -aminoácidos bajo las condiciones pirolíticas (Ratcliff et al., 1974).

Los α -aminoácidos con α -metil-sustituyentes como la α -metilalanina y isovalina se descomponen con producción de las cetonas con un átomo de carbono menos que los aminoácidos padres. Otros procesos primarios son:

a) la descarboxilación (Fig. 2):

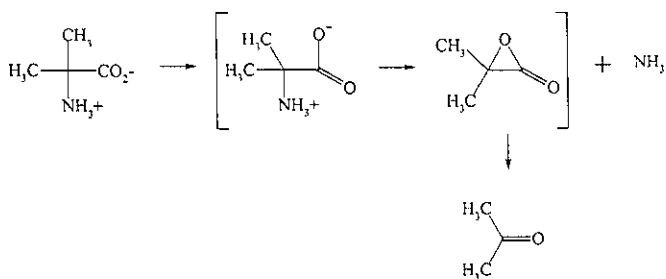


Fig. 2. Descarboxilación de los α -aminoácidos con α -metil-sustituyentes en PD y DCM

b) la desaminación y condensación con la producción de piperazindionas (PDs) y dicetomorfolinas (DCM) como se muestra en la figura 3.

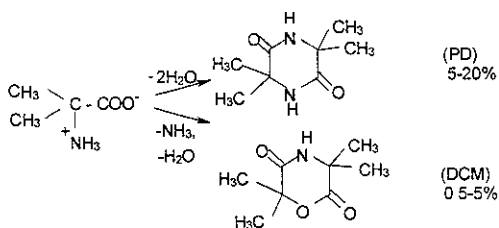


Fig. 3. Proceso de condensación de los α -aminoácidos con α -metil-sustituyentes

Tabla 1. Productos de pirólisis de α -aminoácidos (Ratcliff et al., 1974)

Producción	Alanina	Acido α -amino-n-butirico
20% y mas	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CO}_2^-)\text{NH}_3^+$ $\xrightarrow{-\text{H}_2\text{O}}$ $\text{CH}_3\text{CH}=\text{N}^+\text{NH}_2$ $\xrightarrow{-\text{CO}_2}$ $\text{CH}_2=\text{N}^+\text{NH}_2$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2^-)\text{NH}_3^+$ $\xrightarrow{-\text{H}_2\text{O}}$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{N}^+\text{NH}_2$ $\xrightarrow{-\text{CO}_2}$ $\text{CH}_2\text{CH}_2=\text{N}^+\text{NH}_2$
5-20%	CH_3CN $\text{CH}_3\text{CH}=\text{N}^+\text{NH}_2$ DKP	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN}$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{N}^+\text{NH}_2$ DKP
0.5-5%	C_2H_4 $\text{CH}_2=\text{CN}$ $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CN}$ $\text{CH}_3\text{CH}=\text{NH}_2$ CH_3CHO	C_2H_4 C_2H_6 CH_3CN $\text{CH}_2\text{CH}_2=\text{CN}$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{NH}_2$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHO}$
0.05-0.5%	CO CH_4 $\text{CH}_2=\text{CH}_2$	CH_4 CO CH_3CN $\text{CH}_2=\text{CH}_2$

Los β -aminoácidos sufren la desaminación como la ruta predominante, comparados con los α -aminoácidos (Ratcliff et al., 1974). Como resultado se producen los ácidos α - y β -insaturados y el

moníaco en grandes cantidades. Entre otros productos se encuentran los nitrilos con el mismo número de átomos de carbono de la materia prima y las amidas.

Los γ -, δ - y ϵ -aminoácidos en condiciones pirolíticas producen por el ataque nucleofílico y por deshidratación las lactamas correspondientes en cantidades de más de 95% ó γ -butirolactona en caso de γ -aminoácidos (Fig. 4).

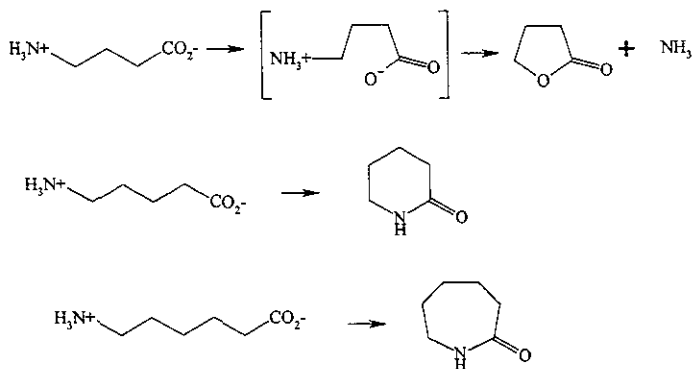


Fig. 4. Formación de lactonas y lactamas correspondientes durante la pirólisis de los γ -, δ - y ϵ -aminoácidos

En un estudio de Basiuk y Navarro-González (1998) se evaluaron las cantidades de algunos aminoácidos simples (ácido α -aminoisobutírico (Aib), L-alanina (L-Ala), L-valina (L-Val) y L-leucina (L-Leu)) y las bases de ácidos nucleicos (uracil, citosina, adenina y guanina), que pueden recuperarse después de un calentamiento rápido a 500°C en una atmósfera de nitrógeno bajo presión atmosférica normal, así como la producción simultánea de las PDs. En este trabajo se encontró que la mayoría de los compuestos (con excepción de guanina) no se descomponen completamente bajo estas condiciones y tienen un porcentaje de supervivencia del orden de 1 a 10%. En el caso específico de los aminoácidos, las PDs se forman en rendimientos similares con la recuperación de los aminoácidos padres.

Hace unos años se utilizó un método sintético para la deshidratación directa de los aminoácidos alifáticos simples en las piperazin-2,5-dionas mediante la sublimación de los aminoácidos en presencia de silicagel como catalizador a temperaturas de 170-250°C y presión reducida (Basiuk et al., 1992). Este método se estableció basándose en una observación de Gross y Grodsky (1955), la

que establece que los aminoácidos simples pueden sublimarse al vacío sin sufrir una descomposición. Por el método de triple sublimación (Basiuk et al., 1992) en presencia de silicagel se sintetizaron las PDs que se utilizaron en el presente estudio.

Los productos minoritarios de pirólisis de los aminoácidos Val y Leu (Basiuk, 1998) y de Ala y Aib (Basiuk et al., 1998b) fueron estudiados por CG/EITF/EM a temperaturas de 500°C. Se identificaron 12 compuestos para la valina: ácido isobutírico, N-isobutilformamida, 2-metilpentan-3-ona, varias amidinas bicyclicas deshidrogenadas, una dicetopiperazina doblemente deshidrogenada y bisimidazolona. Para la leucina los productos de la pirólisis identificados con la misma técnica, fueron más complicados debido al mayor número de probables sitios para la deshidrogenación y la desalquilación. Se identificaron 17 compuestos: ácido isobutírico, ácido 3-metilbutírico, varias amidas, 2,5-diisopropil-piridina, una hidantoina, una pirrolidindiona y una imidazolona. El pico más abundante resultó ser una piperazindiona de leucina (confirmada con una muestra estándar). La amidina bicyclica de leucina no fue encontrada, sin embargo, se identificó su producto de deshidrogenación. Para varios compuestos en este estudio se hicieron las simulaciones de los espectros de infrarrojo (los cuales se referían a los compuestos en vacío), utilizando el programa "HyperChem". Los espectros simulados se compararon con los espectros de los compuestos obtenidos experimentalmente para confirmar la calidad de identificación.

En los trabajos de Basiuk y Navarro-González (1997) y de Basiuk (1998) se propone que las PDs pueden isomerizarse en hidantoinas mediante una migración del grupo carbonilo hacia el átomo de nitrógeno (Fig 5) Esta clase de los productos se detectaron en el caso de la pirólisis de la alanina y leucina a 500°C entre los productos menos volátiles.

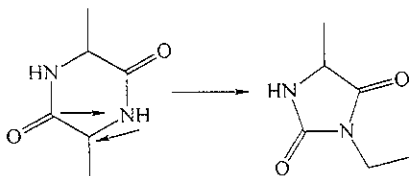
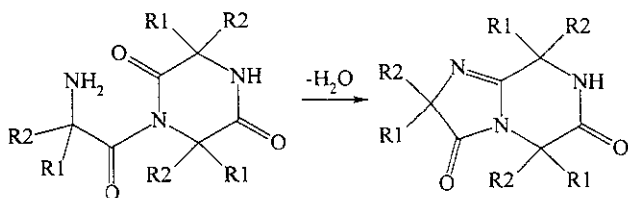


Fig. 5. Isomerización de Ala PD en 3-etil-5-metilhidantoina

También se confirmó (Basiuk and Navarro-González, 1997) la formación de amidinas bi- y tricíclicas, que no habían sido encontradas antes y se propusieron los mecanismos de su

descomposición térmica. Así, hay la posibilidad de que uno de los dos grupos NH en la molécula de PD no solamente forme la unión peptídica, sino también sufra la acilación hasta la formación de la molécula formada de tres moléculas de aminoácidos:



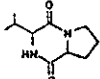
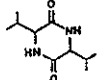
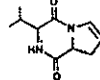

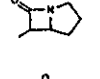
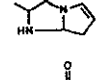

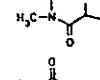
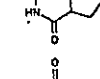

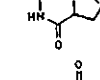

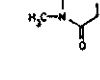

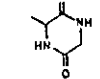




Donde R¹=H, R²=CH₃ para la alanina; R¹=H, R²=CH(CH₃)₂ para la valina; R¹=H, R²=CH₂CH(CH₃)₂ para la leucina. La identificación de la amidina bicíclica del ácido α-aminoisobutírico por CG/EITF/EM fue confirmada mediante resonancia magnética nuclear (Basiuk et al., 1998a-c). Más recientemente este compuesto fue separado, purificado y caracterizado por difracción de rayos X (Basiuk et al., 2000).

1.2.2. Pirólisis de dipéptidos

Los productos de pirólisis de los dipéptidos son distintos de los de las mezclas simples de los aminoácidos que los forman (Simon et al., 1965). Existen algunos estudios sobre la pirólisis de algunos dipéptidos a la temperatura de 500°C por Pi-CG-EM (Val-Pro, Pro-Val, Ala-Pro, Pro-Ala y Ala-Gly) y de las correspondientes PDs (Smith et al., 1988). Los autores identificaron una gran variedad de productos (Tabla 2) y confirmaron la formación de las PDs de los dipéptidos lineales. Además encontraron que las PDs pueden producir entre cuatro y seis productos por la pérdida de H₂O, H₂, CO y/o alquenos (Fig. 6).

Treinta y seis dipéptidos de glicina se analizaron por Py-EM en un trabajo de Hendricker y Voorhees (1996). La ruta más probable de la formación de las PDs a partir de los dipéptidos es la ruptura del fragmento del dipéptido N-terminal con su ciclación simultánea (Fig. 7).

Tabla 2. Productos de pirólisis de los dipéptidos Val-Pro y Pro-Val y de las PDs de Ala-Pro, Ala-Gly y Val-Pro identificados por Pi-CG-EM (Smith et al., 1988).

Pico	Compuesto	PM	Pico	Compuesto	PM
(1)	Acetona	58	(22)		196
(2)	Imidazole	68			
(3)	1-Pirrolina	69			
(4)	Pirrol	67	(23)		198
(5)	Isobutiramida	87	(24)		194
(8)		99			
(9)	Piperidina-2-ona	85	(25)		125
(10)	2-o 3-Cjanopirrol	92	(26)		138
(12)		154	(27)		182
(13)	Isómeto (15)	168	(28)		168
(14)		166	(29)		166
(15)		168	(30)		142
(17)		170	(31)		128
(18)		170			
(19)		210			
(20)		192			
(21)		154			

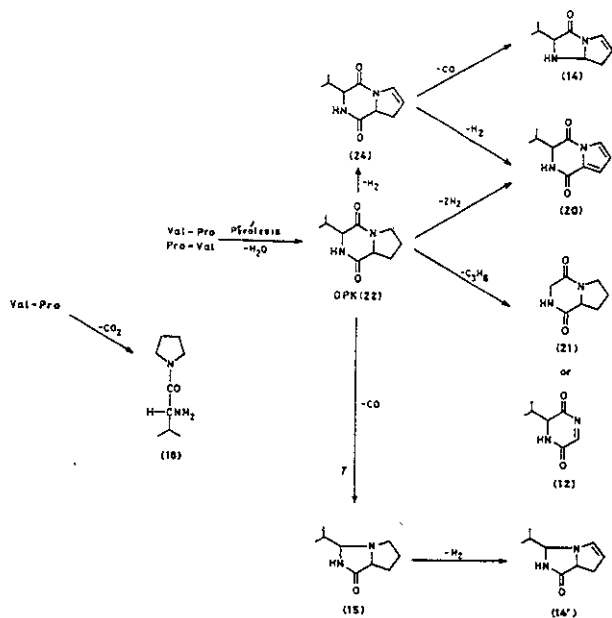


Fig. 6. Productos de pirólisis de las PDs de Val-Pro y Pro-Val (Smith et al., 1988).

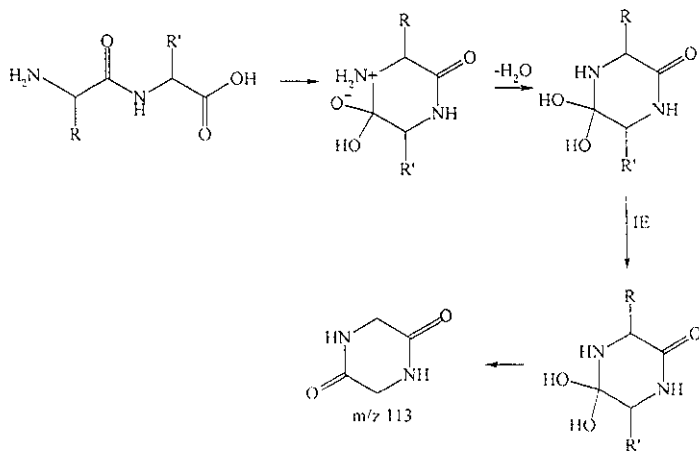


Fig. 7. Mecanismo de formación de piperazin-2,5-dionas (Hendricker y Voorhees, 1996)

La formación de las PDs depende de los sustituyentes en los aminoácidos, sus tamaños y de la naturaleza química. Por ejemplo, los sustituyentes, que contienen los heteroátomos de azufre,

nitrógeno y oxígeno, pueden cambiar la distribución de los productos de la ionización electrónica por la incrementación significativa del número posible de los sitios ionizados y de las rutas de fragmentación, lo cual a su vez, cambia la ruta de reacción; como ejemplo los dipéptidos Gly-Asp, Gly-Asn, Gly-Glu, Gly-Gln y Gly-Arg. Estos efectos son muy complicados y es difícil de caracterizarlos completamente. Si el átomo de hidrógeno del heteroátomo en el sustituyente está en posición γ con respecto al átomo de oxígeno del grupo carbonílico, se favorece la polarización de la unión carbonílica y hace al átomo de carbono del grupo carbonílico más sensible al ataque nucleofílico, lo cual facilita la formación de PD de Gly-Cys, Gly-Ser y Gly-Thr. Estas reacciones ocurren con igual frecuencia antes y después de la ionización electrónica. Adicionalmente, se pueden formar los péptidos con una longitud de cadena de hasta seis aminoácidos.

De esta manera, la formación o ausencia de las PDs como marcadores específicos para ciertos dipéptidos, puede servir como un método de identificación de dipéptidos en soluciones y mezclas. También la identificación de dipéptidos puros por la formación de las PDs, observada por Pi-EM, es más rápida que el análisis por Pi-CG-EM y no requiere derivatización o alguna otra preparación de las muestras que pudiera complicar el análisis.

1.2.3. Pirólisis de oligopéptidos

Las PDs se forman también por la descomposición térmica de oligopéptidos (Voorhees, 1994). Los oligopéptidos que contienen un número impar de aminoácidos, producen las PDs mas el aminoácido con C-terminación libre. La formación de las PDs ocurre cuando los grupos amino en los aminoácidos de N-terminaciones se ciclan con el siguiente aminoácido, dando como resultado una cadena peptídica menor.

Así, en el caso de los tripéptidos se eliminan los aminoácidos con C-terminación (Hendrickson and Voorhees, 1996):



en donde A, B, C son fragmentos de aminoácidos.

No se observa la formación de B-C(PD) o el aminoácido A libre (Fig. 8)

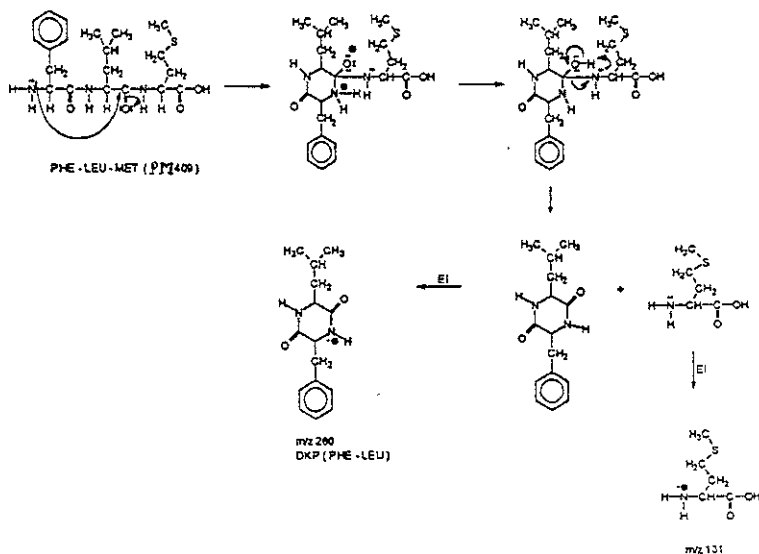
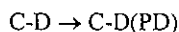
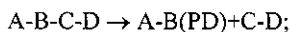


Fig. 8. Formación de las PDs de los tripéptidos (Hendricker and Voorhees, 1996)

Para los tetrapéptidos la ruta pirolítica es:



Y no se detectan B-C(PD) o aminoácidos libres.

Los pentapéptidos y hexapéptidos presentan mecanismos de pirólisis parecidos a los de los tripéptidos y tetrapéptidos, respectivamente.

1.2.4. Pirólisis de polipéptidos

A pesar de que los procesos de la pirólisis de aminoácidos son bien conocidos, hay relativamente poca aplicación de estos conocimientos en el análisis de polipéptidos o proteínas. Estos procesos fueron discutidos por Fujimaki (1969), Higman (1970), Kato (1970), Patterson (1978) e Irwin (1982). El resumen de los fragmentos característicos observados en proteínas identificados por la técnica Pi-EM se presenta en la Tabla 3

Tabla 3. Iones característicos de las proteínas observados por Pi-EM (Irwin, 1982).

M/z	Compuesto	M/z	Compuesto
17	Amoniaco	81	Alquilpirrol
28	Etileno	83	Metilbutanonitrilo
30	CH ₂ =N ⁺ H ₂	92	Tolueno
34	Sulfuro de hidrógeno	94	Fenol
41	Acetonitrilo	104	Estireno
42	Propileno	108	Cresol
44	Dióxido de carbono	109	C ₃ -alquilpirrol
48	Metanetiol	117	Indol
55	Propionitrilo	117	Fenilacetronitrilo
56	Buteno	120	C ₃ -alquilbenceno
67	Pirrol	131	Metilindol
69	Butanenitrilo	145	C ₂ -alquilindol
70	Metilbuteno		

La técnica Pi-EM puede ser útil para obtener los pirogramas de masas para identificación. La presencia de ciertas series de iones refleja los resultados de Pi-CG y permite establecer algunas conclusiones directas. Por ejemplo, el pico a m/z 34 (H₂S) es significativamente más abundante para albúmina que para pepsina (Irwin, 1982; Meuzelaar et al., 1973, 1974, Posthumus et al., 1974) y refleja una mayor proporción de los aminoácidos que contienen azufre (Zemany, 1952)

La pirólisis de poli- α -aminoácidos (poli-Ala, poli-Phe, poli-Gly, poli-Sar, poli- γ -metil-Glu y poli-Pro) y el análisis por espectrometría de masas presentan evidencias sobre la formación de algunos oligómeros cíclicos (poli-Gly, poli-Sar, poli-Pro), así como sobre su descomposición y la formación de los productos olefinicos y nitrogenados (Ballistreri et al., 1985a,b). Ellos evaluaron que la estabilidad térmica varía para los compuestos analizados y la temperatura de descomposición es de 230°C para poli-Sar; de 360°C para poli-Gly; de 460°C para poli-Pro; para poli-Ala y para poli-Phe el intervalo de temperaturas es de 350-400°C, en el caso de poli-Tyr hasta 40% del peso de la macromolécula se conserva hasta la temperatura de 800°C Para poli- γ -metil-Glu la mayor pérdida de peso se observa a temperaturas de 330-340°C, pero hasta 20% del peso se conserva hasta los 800°C.

En los estudios de la pirólisis del cabello humano por Pi-CG-EM (Munson and Vick, 1985, Munson and Petterolf, 1987), se presenta otra posible ruta para la formación de las PDs: la ruptura

dentro de la cadena de un poli-aminoácido y sin involucrar los residuos de los aminoácidos terminales (Fig. 9).

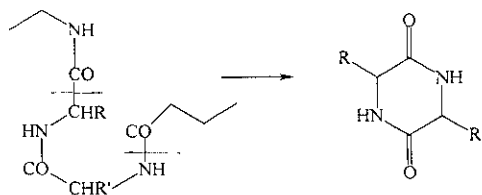
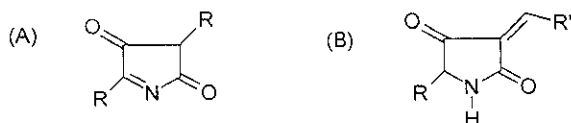


Fig. 9. Formación de piperazindionas durante la pirólisis anaeróbica del cabello (Munson y Peterolf, 1987)

El análisis Pi-CG-EM (Boon and Leeuw, 1987) de poliaminoácidos, proteínas y de materiales complejos proteínicos fue usado para los estudios del comportamiento pirolítico de los fragmentos con aminoácidos alifáticos (valina, leucina, isoleucina y alanina). Los datos de Pi-CG-EM apuntan a los fragmentos característicos de Val-Val, Val-Leu, Leu-Val y Leu-Leu en las muestras de hemoglobina; Val-Val, Val-Leu, Ile-Ile, Ile-Leu y Leu-Leu en las muestras de mioglobina; y Val-Val, Val-Leu, Leu-Val, Ile-Ile, Leu-Ile, Leu-Leu en las muestras de suero de albúmina de bovinos. La composición de estos fragmentos ayuda a entender lo que está ocurriendo en estas proteínas bajo las condiciones pirolíticas y permite relacionar la intensidad de los picos en los espectros de masas de la pirólisis con la ocurrencia de estos fragmentos en las proteínas. Para fines de cuantificación se necesita establecer la calibración con compuestos de referencia.

Dos picos en el cromatograma de CG-EM de la poli-Ala (Boon and Leeuw, 1987) presentan espectros de masas muy parecidos, pero tiempos de retención diferentes. La posibilidad de la isomería cis/trans en este caso fue excluida (por reducción del número de posibilidades en la posición del doble enlace) y se propusieron la 3,5-alquil-3,4-dihidro-2H-pirrolidin-2,4-diona (A) y la 3-alquenil-5-alquil-pirrolidin-2,4-diona (B) como los productos de la pirólisis más probables:



Estas moléculas tienen cadenas laterales diferentes, que indican la composición diferente de los aminoácidos alifáticos en las proteínas estudiadas.

1.2.5. Pirólisis de ácidos nucleicos

La pirólisis analítica de los ácidos nucleicos depende mucho de las condiciones experimentales (Irwin, 1982). Esto se refleja en diferencias significativas de reactividad, polaridad y volatilidad asociadas con las unidades de azúcar, fosfóricas y heterocíclicas. Según Posthumus (1974), Levsen y Schulten (1976) para distinguir los productos de la pirólisis de las bases nitrogenadas es suficiente analizar los productos más volátiles. En particular, los fragmentos identificados frecuentemente son cianógeno (producido solo en las purinas), acetonitrilo, propionitrilo y acrilonitrilo. La presencia de estos productos está relacionada con la pirólisis de las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y D-ribosa a temperaturas de 800-850°C. El etileno es el producto mayor en todos los casos, aparte del acetonitrilo y propionitrilo en los casos de citosina y timina, respectivamente. Las bases de algunos dinucleótidos pueden distinguirse por las proporciones relativas de los productos de nitrilos en los pirogramas, pero no hay información detallada al respecto. Levsen y Schulten (1976) estudiaron la pirólisis de los nucleótidos y analizaron los productos resultantes. Estos compuestos no son tan volátiles como las bases de ácidos nucleicos, las cuales no se detectan en las pirogramas a temperaturas de 610°C. Sin embargo, los resultados de estos estudios no permiten la evaluación de la supervivencia de las bases nitrogenadas a diferentes temperaturas para la química prebiótica.

1.3. Implicaciones de la pirólisis de las biomoléculas para el origen de la vida

Para entender cómo las primeras formas de vida evolucionaron en la Tierra a partir de la materia no-viva, se necesita saber primero cómo las moléculas biológicas más simples (aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc.) aparecieron en el planeta. Las evidencias geológicas y los modelos fotoquímicos contemporáneos sugieren la existencia de una atmósfera para la Tierra primitiva compuesta principalmente de dióxido de carbono, probablemente con un porcentaje pequeño de monóxido del carbono, nitrógeno y vapor de agua (Holánd, 1984; Kasting, 1990, 1993; Walker, 1986). Es difícil explicar cómo los compuestos orgánicos pudieron formarse en tal ambiente no-reductor

Por esta razón, la idea de la entrega extraterrestre de la materia orgánica (por cometas, asteroides, meteoritos o partículas del polvo interplanetario) a la Tierra Primitiva, es ahora especialmente atractiva (Anders, 1989; Chyba, 1990, 1993; Chyba and Sagan, 1992, 1997, Chyba et al., 1990, 1993, 1995, Greenberg, 1989; Greenberg and Mendoza-Gómez, 1992; Maurette et al.,

1995; Oberbeck et al., 1989; Oró, 1961; Steel, 1992; Whittet, 1997; Zahnle and Grinspoon, 1990; Basiuk and Navarro-González, 1995).

Hay pruebas indiscutibles de que las biomoléculas pudieron alcanzar la superficie de la Tierra transportadas en condritas carbonaceas (Cronin, 1989; Cronin y Moore, 1971; Cronin y Pizzarello, 1983, 1997; Cronin et al., 1980; Kotra et al., 1979; 1979; Stoks y Schwartz, 1979, 1981). En algunos casos, la concentración de los aminoácidos alcanza niveles muy considerables, del orden de 1-10 $\mu\text{g/g}$ (Cronin y Moore, 1971; Kvenvolden et al., 1970; Engel y Macko, 1997), demostrando que las biomoléculas pueden protegerse eficazmente del calor dentro de los cuerpos espaciales: según Sears (1975) las temperaturas pirolíticas ($>600^\circ\text{C}$) alcanzan sólo una profundidad de aproximadamente 1 mm en los meteoritos. Por otro lado, la contribución (por lo menos hasta ahora) de la materia orgánica meteorítica se estima muy insignificante, de muy pocos kilogramos de carbón orgánico por año (Anders, 1989).

El análisis de los extractos de los meteoritos Murray, Murchison y otros más, después de una hidrólisis ácida demostró la presencia de 21 aminoácidos, de los cuales 9 son proteicos (Val. Gly, Ala, Pro, Tyr, Ser, Ile, Asp. Glu) y 12 no-proteicos (isovalina, β -alanina, ácido α -aminoisobutírico, ácido β -aminoisobutírico, N-metilalanina, N-metilglicina, N-etilglicina, norvalina, ácido α -amino-n-butírico, ácido β -amino-n-butírico, ácido γ -amino-n-butírico y ácido piperídico) (Lawless et al., 1971; Shimoyama et al., 1979; Kvenvolden et al., 1970; 1971). Además, en los meteoritos Orgueil, Murray y Murchison detectaron las purinas xantina, hipoxantina, adenina y guanina, y las pirimidinas citosina, timina, uracil, 4-hidroxipirimidina, 4-hidroxi-2-metilpirimidina y 4-hidroxi-6-metilpirimidina (Van der Velden and Schwartz, 1977).

Hay otros tipos de cuerpos espaciales considerados como los vehículos posibles de la materia orgánica extraterrestre: asteroides, cometas y partículas de polvo interplanetario (Tabla 4). El destino de los compuestos orgánicos depende mucho de la naturaleza del cuerpo, tamaño e historia térmica; esta última no siempre está muy clara por la falta de evidencias experimentales. Para cometas, que son cuerpos de hielo, la descomposición catastrófica en el aire con dispersión de energía a través de la evaporación de componentes volátiles (básicamente el agua) fue sugerida como el escenario más probable donde es posible un alto grado de supervivencia de las moléculas orgánicas (Chyba y Sagan, 1992; Chyba et al., 1990, 1995; Greenberg, 1989; Greenberg y Mendoza-Gómez, 1992; Greenberg y Remo, 1997, Thomas y Brookshaw, 1997). Debido al carácter esponjoso de los cometas y del polvo cometario (Greenberg y Hage, 1990) es probable que una gran

parte del polvo, formado después de la ablación durante la entrada a la atmósfera, incluso a los tamaños de partículas de $\sim 10^{-5}$ m. solo se calentarían ligeramente (comparado con los asteroides).

La materia orgánica contenida en asteroides de un tamaño relativamente pequeño tiene menos oportunidades para sobrevivir, esto es cierto para los asteroides de 100 m de radio (estimaciones por Chyba et al., 1990) ya que no pueden frenarse eficazmente al entrar a la atmósfera.

Otros vehículos muy importantes son las partículas del polvo interplanetario. se considera que ellos son la fuente más abundante de la materia extraterrestre (Anders, 1989; Basiuk y Navarro-González, 1995; Chyba, 1990, 1993; Chyba y Sagan, 1992, 1997; Chyba et al., 1990, 1995, Maurette et al., 1995; Maurette, 1998; Oberbeck et al., 1989; Steel, 1992; Whittet, 1997; Zahnle y Grinspoon, 1990). Según diferentes estimaciones, el flujo contemporáneo de polvo interplanetario alcanza de 10^6 a 10^7 kg por año (Esser y Turekian, 1988; Kyte y Wasson, 1986; Love y Brownlee, 1993; Maurette et al., 1995; Maurette, 1998) en los cuales la materia carbonácea constituye una parte sustancial (del orden de 10%) (Anders, 1989).

El núcleo de estas partículas puede sujetarse a temperaturas altas durante el pasaje por la atmósfera, pero el destino final de una partícula depende mucho de su tamaño, velocidad y ángulo de entrada a la atmósfera (Love y Brownlee, 1991). En particular, según Hunten et al (1980) los meteoroides del tamaño de un milímetro y menores se evaporan completamente; este evento ocurre básicamente en la región de altitud entre 80 a 100 km (Love y Brownlee, 1991). De los estudios de micrometeoroides recuperados del hielo Antártico, Maurette (1998) y Maurette y colaboradores (1992, 1995) concluyeron que algunas partículas de $100\mu\text{m}$ de tamaño también pueden sobrevivir el pasaje atmosférico sin una alteración térmica sustancial.

Según Zolensky y Mackinnon (1985), para partículas de 1-5 μm , la velocidad de su sedimentación es sumamente lenta, tardarían varios años para que caigan de una altitud de 1700 km hasta la estratósfera (17-19 km). Entonces, para las partículas del tamaño $<1\ \mu\text{m}$, esta velocidad debe ser aún más baja; debido a eso, ellas no deben calentarse en absoluto y alcanzar intactas la superficie de la Tierra. Así, no sólo las propiedades químicas sino también, las propiedades quirales de las moléculas formadas en el medio interestelar (Bonner, 1991; Greenberg y Li, 1996, Greenberg et al., 1994) se conservarían para mantener las "semillas de la vida".

De esa manera, analizando cuerpos espaciales diferentes como vehículos posibles de la materia orgánica extraterrestre, se encuentra un espectro amplio de los historiales térmicos, desde calentamiento nulo hasta los impactos violentos a la superficie terrestre, donde las temperaturas

pueden exceder 10,000°C (Tabla 4). Esto significa que las biomoléculas tendrían muy altas o prácticamente nulas oportunidades de supervivencia, lo cual permite predecir los casos extremos tales como las partículas muy pequeñas y los asteroides, respectivamente. Sin embargo, se puede esperar que existan muchos casos intermedios, por ejemplo, aquellos que involucran las partículas del tamaño mediano y cometas, donde el calentamiento puede variar en el intervalo de 100 a 1000°C.

Los resultados publicados anteriormente por otros autores y mencionados en los párrafos 1.2.1.-1.2.5. demuestran una gran complejidad de los procesos pirolíticos de las biomoléculas tipo aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, pero no contienen ninguna información sobre la supervivencia de la materia prima, lo que tendría relación más directa al problema de la entrega extraterrestre de las biomoléculas a la Tierra primitiva.

Tabla 4. Clasificación de los cuerpos cósmicos como vehículos posibles de las moléculas orgánicas extraterrestres y sus historiales térmicos

Cuerpos cósmicos	Tamaño, m	Historias térmicas
Polvo interplanetario	$< 10^{-6}$	No se calientan
	$10^{-6} - 10^{-5}$	Calentamiento ligero hasta $< 500^{\circ}\text{C}$
	$10^{-5} - 10^{-3}$	Calentamiento hasta evaporación total
Meteoritos	$10^{-3} - 10^1$	Calentamiento superficial hasta < 1 mm de profundidad
Asteroides	> 10	Impactos explosivos: hasta $> 10,000^{\circ}\text{C}$
Cometas	> 10	Explosión ("disrupción") en el aire: calentamiento moderado

Además, existe un detalle experimental muy importante, que siempre falta por incluir en los estudios pirolíticos para que sean geocosmoquímicamente realistas. Se tiene que recordar que los aminoácidos, purinas y pirimidinas constituyen nada más una minúscula parte de materia meteorítica (lo más probable también es el caso de los núcleos cometarios y las partículas condriticas interplanetarias de polvo) y al mismo tiempo, los compuestos inorgánicos superan en porcentaje. Particularmente, son muy abundantes varios silicatos, que muestran un espectro amplio de propiedades catalíticas y así deben ser tomados en cuenta en los estudios de transformaciones pirolíticas de los compuestos orgánicos (Basiuk and Navarro-González, 1998), especialmente porque están presentes en todos los cuerpos espaciales ricos en la materia orgánica (Jessberger et al., 1988; Mackinnon y Rietmeijer, 1987; Mason, 1971; Rietmeijer y Mackinnon, 1985b; Wasson, 1985).

En los trabajos sobre la sublimación de aminoácidos a temperaturas alrededor de 200°C y presión reducida, se tomó en cuenta la relación entre la materia inorgánica y orgánica (Basiuk, 1992, 1998; Basiuk et al., 1998a,c; Gromovoy et al., 1991). En estos estudios se utilizó sílice amorfa o lava basáltica pulverizada como catalizadores y se encontró un efecto catalítico importante en la formación de enlaces peptídicos. Además, la formación de dos tipos de compuestos poco comunes, las hexahidroimidazo[1,2-a]pirazin-3,6-dionas o amidinas bicíclicas y hexahidroimidazo[1,2-a]imidazo[1,2-d]pirazin-3,8-dionas o amidinas tricíclicas que fueron detectadas en rendimientos significativos (Basiuk, 1992, Basiuk and Navarro-González, 1997; Basiuk et al., 1998c). Estos compuestos son muy interesantes desde el punto de vista de nuestros estudios y de la química de aminoácidos y péptidos, sin embargo, con la excepción de dos derivados del ácido α -aminoisobutírico, nunca antes habían sido sintetizados y caracterizados. Las imidazopirazinas se descomponen parcialmente *in situ* formando varios productos de degradación.

2. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

La parte importante del presente trabajo fue la evaluación de la supervivencia de la materia gánica para la química prebiótica. El grado en que los compuestos orgánicos contenidos en los meteoritos podrían representar el inventario total de las moléculas biológicas en la Tierra primitiva, dependería básicamente de la capacidad de estas moléculas de sobrevivir a las temperaturas altas durante la deceleración atmosférica y los impactos en la superficie terrestre.

Aunque algunas evaluaciones indirectas de la supervivencia de las moléculas biológicas a temperaturas altas han sido publicadas, Chyba et al. (1990) basándose en las proporciones de descomposición térmica de aminoácidos en solución, se sugería que las moléculas estudiadas sobrevivirían a las temperaturas alrededor de 500°C sólo durante 1 segundo. Sin embargo, existe una falta evidente de datos experimentales sobre el comportamiento de estas moléculas en las condiciones pirolíticas.

La simulación del comportamiento térmico de las moléculas biológicas a la entrega extraterrestre en la Tierra Primitiva, necesita la consideración de temperaturas altas, por arriba de los 500°C. Por ahora, los únicos experimentos de este tipo han sido informados para 4 aminoácidos y algunas purinas y pirimidinas por Basiuk y Navarro-González (1998) y la única temperatura estudiada fue 500°C, sin considerar temperaturas más altas.

Por otro lado, el propósito más frecuente de las investigaciones de la pirólisis de compuestos de interés biológico es identificar los productos de la pirólisis, en lugar de evaluar la supervivencia de las moléculas.

Un detalle importante es que las moléculas biológicas en los cuerpos cósmicos se encuentran más frecuentemente en forma de los oligómeros y polímeros, por esta razón también es importante estudiar el comportamiento pirolítico de los poli-aminoácidos e identificar los productos de su descomposición térmica, especialmente, la producción de los compuestos que se puedan recuperar en los aminoácidos después de la hidrólisis tales como, piperazin-2,5-dionas, hidantoinas, amidinas bicíclicas y tricíclicas.

También hay que tomar en cuenta que en muchos trabajos anteriores se utilizaba la técnica de la pirólisis instantánea ("Curie-point pyrolysis") la cual no permite establecer el tiempo de equilibrio suficiente a una temperatura dada y, por lo tanto, muchas de las reacciones de descomposición se terminan únicamente al nivel de los productos primarios (Tabla 1). Además, los experimentos

comunes "en línea" hacen que el análisis de los productos menos volátiles sea imposible, debido a su baja volatilidad y a que no producen señales bien definidas en los cromatogramas; por lo tanto, no pueden ser analizados por cromatografía de gases. Por otro lado, la mayoría de los productos de gran interés en el presente estudio son los compuestos de peso molecular elevado. La técnica de pirólisis "fuera de línea" con energía continua, con un horno eléctrico y reactor de cuarzo (descrito en la sección 4.1; Fig. 9) que se aplicó en el presente trabajo, permite un tiempo suficiente para que el proceso de descomposición de los compuestos analizados se termine completamente y permite analizar de los productos de la pirólisis menos volátiles que son parte del propósito de este trabajo. Después, los productos de pirólisis condensados se extraen con un disolvente y se identifican y cuantifican por HPLC.

Para la identificación de los productos de la pirólisis de los compuestos biológicos otros autores, mencionados en la parte introductoria, requirieron las técnicas de Pi-EM, Pi-CG, Pi-CG-EM, CG-EM o CG-EITF. En esta tesis se utilizó la técnica de pirólisis "fuera de línea" y CG-EITF-EM acopladas. La técnica CG-EITF-EM acoplada para la identificación de los productos de pirólisis obtenidos, es actualmente la herramienta más poderosa de separación e identificación de mezclas complejas de compuestos orgánicos. Mediante esta técnica se obtienen dos tipos de espectros (espectros de masas y de infrarrojo), por lo que aumenta la confiabilidad de los resultados.

Muchos investigadores mencionan que la atmósfera primitiva fue compuesta por el dióxido de carbono como compuesto mayoritario y que probablemente contenía un porcentaje pequeño de monóxido de carbono, nitrógeno y vapor de agua (Holland, 1984; Kasting, 1990, 1993; Walker, 1986). Por esta razón en el estudio presente se utilizaron N_2 y CO_2 para modelar las más importantes atmósferas en la Tierra primitiva y evaluar la influencia de la atmósfera en los resultados de la pirólisis.

Además, se tiene que recordar que los aminoácidos, purinas y pirimidinas constituyen nada más una minúscula parte de la materia meteorítica y los compuestos inorgánicos (silicatos, que muestran un espectro amplio de propiedades catalíticas y así deben ser tomados en cuenta en los estudios de transformaciones pirolíticas de los compuestos orgánicos) las superan en porcentaje. En este trabajo se tomó en cuenta dicho factor, utilizando a la silicagel como un modelo de la materia inorgánica y evaluando su influencia catalítica en los procesos pirolíticos en los aminoácidos (cualitativamente y cuantitativamente)

3. OBJETIVOS

- Llevar a cabo la pirólisis de los aminoácidos, purinas y pirimidinas a temperaturas de 400°C a 1000°C utilizando las atmósferas de N₂ y CO₂ como un modelo de la atmósfera en la Tierra Primitiva.
- Evaluar la supervivencia de los aminoácidos, de las purinas y de las pirimidinas a temperaturas entre 400°C y 1000°C, la formación de piperazindionas en el caso de los aminoácidos y el efecto de la atmósfera utilizada.
- Cuantificar la pirólisis de los aminoácidos en presencia de gel de sílice, como un catalizador modelo a temperaturas de 400°C a 1000°C y evaluar su efecto catalítico sobre la supervivencia de los aminoácidos y la producción de las piperazindionas.
- Determinar los productos producidos en las transformaciones térmicas de los aminoácidos a temperaturas de 500°C en la presencia de gel de sílice, por cromatografía de gases acoplado con espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas.
- Determinar los productos producidos en las transformaciones térmicas de los poli-aminoácidos a temperaturas de 500°C, por cromatografía de gases acoplada con espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Equipos y accesorios

Para pesar las muestras se utilizó una balanza Sartorius (BP toploaded balances, Serie BP310S) la cual tiene una sensibilidad de ± 0.0001 g.

Las muestras en estudio se analizaron cuantitativamente mediante un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard 1090 Serie II, con un detector de UV tipo "arreglo de diodos". Las columnas cromatográficas fueron las siguientes:

- a) una columna de 100×2.1 mm d.i. empacada con Hypersil ODS RP-18 de 5 μ m
- b) una columna de 250×4 mm d i empacada con Spherisorb ODS 2 RP-18 de 5 μ m.

El uso de las columnas diferentes fue necesario para la optimización del proceso cromatográfico y se discute en la sección 5.

Los productos se analizaron cualitativamente utilizando la técnica acoplada CG/EITF/EM. Para la cromatografía de gases se utilizó el cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II Plus acoplado paralelamente a un espectrómetro de masas tipo cuadrúpulo HP 5989B y un detector de infrarrojo HP 5965B FTIR, ambos de Hewlett Packard. La columna utilizada fue una Ultra 1 (Hewlett Packard) de sílice fundida de 50 m de longitud, 0.20 mm de diámetro interno y un grosor de película de 0.33 μ m (fenil-metil-silicona).

Para los experimentos de pirólisis se utilizó el arreglo experimental mostrado en la Figura 9. El reactor de cuarzo fundido, diseñado especialmente para estos experimentos, tiene una longitud de 17 cm, el grosor de sus paredes es de 3 mm: esto asegura un calentamiento rápido de la muestra a una temperatura dada, lo cual permite simular el calentamiento de las moléculas biológicas durante la entrada atmosférica de cuerpos espaciales y sus impactos en la superficie de la Tierra. La manera adicional de lograr el mismo propósito se realizó con el uso de pequeños vasos de papel aluminio muy ligeros (menos de 0.1 g) usando cantidades pequeñas de los compuestos a estudiar (0.5 g para todos los aminoácidos y las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos)

La muestra a pirolizar se puso en el vaso de papel aluminio y se instaló dentro del tubo por arriba del reactor del cuarzo (Fig 9: 3a). Cuando la temperatura del reactor estaba equilibrada, el vaso se dejaba caer al fondo del reactor (3b) y se quedaba ahí durante el tiempo de análisis correspondiente. El gas acarreador (nitrógeno o dióxido de carbono) entraba por el tubo 7 y salía por el tubo 8, lo cual permitió mantener dentro del reactor (1) una presión atmosférica y simular la

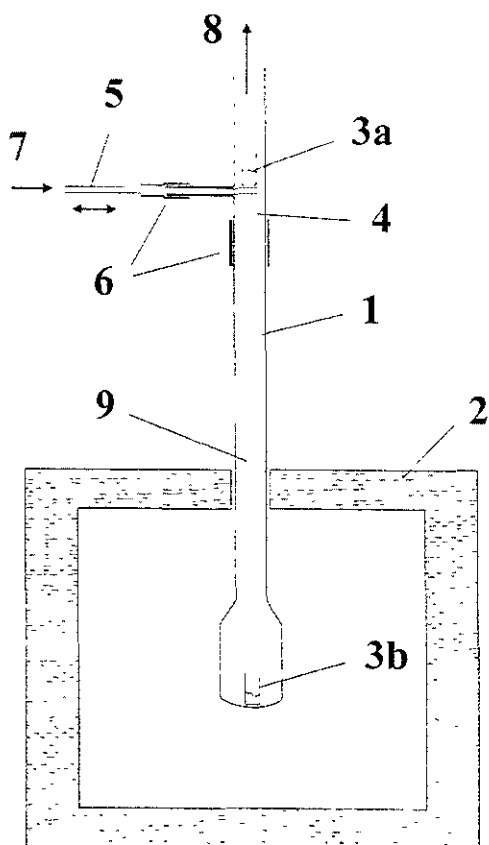


Fig. 9. Arreglo experimental para los estudios de pirólisis de los aminoácidos y las bases de los ácidos nucleicos:

- (1) reactor de cuarzo fundido;
- (2) horno (Isoterm® de Fischer Scientific);
- (3) aminoácidos o bases de los ácidos nucleicos en un vaso de papel aluminio:
 - (a) antes y (b) durante la pirólisis;
- (4) tubo de vidrio;
- (5) tubo de polipropileno;
- (6) tubos de conexión de hule;
- (7) entrada del gas acarreador (N_2 o CO_2);
- (8) salida del gas y del humo;
- (9) sublimado.

atmósfera en la Tierra primitiva (la cual se discute en las secciones 1.3, 5.2.3. y 5.3). Los compuestos más volátiles salían con el gas acarreador por el tubo 8 y el sublimado se quedaba en la parte inferior (9) del reactor arriba del horno. Después de terminar el experimento, el horno se apagaba y se abría y el reactor se enfriaba a temperatura de ambiente.

4.2. Disolventes y reactivos

4.2.1. Disolventes y reactivos

Para los estudios de la recuperación de los compuestos biológicos se utilizaron los aminoácidos disponibles comercialmente: glicina (Gly) de Aldrich (Milwaukee, WI, USA) con pureza de 98.5%, L- α - y β -alanina (Ala y β -Ala, respectivamente) de Sigma Grade (St Louis, MO, USA), ácido α -aminoisobutírico (Aib), L-valina (Val) y L-leucina (Leu) de Aldrich de la pureza de 99%, L-prolina (Pro), L-fenilalanina (Phe), ácidos L-glutámico (Glu) y L-piroglutámico de Sigma Ultra con pureza superior a 99%, pirimidinas (uracilo y citosina) y purinas (adenina y guanina) de Sigma de 99% de pureza y silicagel de Aldrich.

Para los estudios de pirólisis de los poli-aminoácidos se utilizó poli-glicina (poli-Gly), poli-valina (poli-Val) y poli-L-alanina (poli-L-Ala), disponibles comercialmente (Sigma, 99% de pureza).

Las muestras auténticas de los PDs, cyclo-Aib₂, ciclo-(L-Ala)₂, ciclo-(L-Val)₂, ciclo-(DL-Val)₂, ciclo-(L-Leu)₂, ciclo-(DL-Leu)₂, ciclo-(L-Pro)₂ fueron sintetizados previamente por el método de triple sublimación por el grupo de Basiuk en el Instituto de Química de Superficies de la Academia de Ciencias de Ucrania, Kiev (Basiuk et al., 1992). Los PDs fueron recrystalizados y son cromatográficamente homogéneos. Estos compuestos fueron analizados por refractometría, cromatografía de líquidos, cromatografía de gases, espectrometría de masas y espectroscopía de infrarrojo. Las muestras de ciclo-Gly₂ y ciclo-(DL-Ala)₂ se utilizaron de Aldrich de 99% de pureza.

Los disolventes metanol y cloroformo utilizados fueron de Aldrich de pureza de 99.9% y 99.8% (grado cromatográfico), respectivamente; el ácido trifluoroacético (TFA) fue de pureza de 99% y etanol fue de Malinkrodt con pureza de 99.9% (grado cromatográfico).

Para la cromatografía de gases se utilizó como gas acarreador el helio (grado cromatográfico, Praxair Inc.).

4.2.2. Preparación de las soluciones estándar

Para el análisis cuantitativo de los productos de la pirólisis de los aminoácidos y bases de los ácidos nucleicos, se prepararon las soluciones estándar de las bases de ácidos nucleicos, de los aminoácidos y sus piperazin-2,5-dionas y para estas se analizaron las áreas de los picos de los cromatogramas obtenidos por HPLC.

Las soluciones estándar se prepararon disolviendo 50, 40, 30, 20, 10, 5 y 1 mg de los compuestos a analizar en 100 mL (el aminoácido y su PD correspondiente en el mismo volumen) de disolventes correspondientes (sección 5.1.2.; Tabla 7). Los intervalos de la concentración fueron escogidos por comparación con los intervalos de recuperación de los compuestos a analizar. A partir de las diferentes concentraciones se obtuvieron las áreas de los picos en los cromatogramas. Por ejemplo, para la glicina y su PD los resultados de la cuantificación se muestran en la Tabla 7.2.1. (Apéndice 7.2, p.108). Para la leucina y su PD, adenina, uracilo y citosina los resultados a diferentes temperaturas se presentan en las Tablas 7.2.2, 7.2.3, 7.2.4 y 7.2.5, respectivamente (Apéndice 7.2. p.109-112).

4.3. Procedimientos de pirólisis

4.3.1. Procedimiento para la pirólisis de los aminoácidos y las bases de los ácidos nucleicos

Los experimentos de pirólisis para cada compuesto y cada temperatura se hicieron una vez, excepto para el uracilo (sección 5.1) para demostrar la reproducibilidad de los resultados. Las muestras de los aminoácidos y las bases de los ácidos nucleicos se pesaron en las balanzas en cantidad de 0.5 g en un vaso de papel aluminio y se colocaban al tubo de vidrio arriba del reactor (Fig. 9). El horno se dejaba en equilibrio a cada una de las temperaturas estudiadas (400-1000°C) con el flujo continuo de gas acarreador (N_2 o CO_2). Cuando la temperatura del reactor estaba equilibrada en el horno, el vaso de aluminio se soltaba moviendo el tubo horizontal de polipropileno y se dejaba caer al fondo del reactor

La volatilidad de los compuestos y la evolución del humo durante la pirólisis dependía de la temperatura (sección 5.1). El sublimado, que normalmente se formaba en las paredes del reactor sobre el horno, contenía los compuestos condensados con un peso molecular relativamente alto. los cuales se analizaron en el estudio presente

4.3.2. Procedimiento para la pirólisis de los aminoácidos valina y leucina en presencia de silicagel

Para el estudio de los productos de la pirólisis de aminoácidos en la presencia de un óxido mineral SiO_2 (silicagel) se utilizaron muestras de 0.5 g de leucina y valina como representantes de los aminoácidos a temperaturas de 400 a 1000°C en atmósfera de N_2 . La silicagel en cantidad de 10g fue puesta en el reactor de cuarzo (Fig. 3) antes de empezar el calentamiento del horno; otras condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas anteriormente.

4.3.3. Procedimiento para la pirólisis de poli-aminoácidos

La pirólisis de los poli-aminoácidos se realizó con el mismo arreglo experimental, anteriormente descrito, utilizando una atmósfera de nitrógeno y una muestra de 0.2 g del poli-aminoácido y la temperatura del horno fue 500°C. La duración del experimento fue de 15 minutos. Los compuestos condensados fueron extraídos con cloroformo y se analizaron por CG/EITF/EM

4.3.4. Preparación de las muestras del condensado

Después de terminar el experimento, el horno se enfriaba, el reactor se desconectaba, y el sublimado se trataba con diferentes disolventes: con agua doblemente destilada (en el caso de Gly, Ala, β -Ala y Glu), o con una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1 (Ala, Pro, Phe, Val, Leu, uracil y adenina) ó 0.1% de una solución acuosa de ácido trifluoroacético TFA (citosina). El uso de los diferentes disolventes (sección 5.1.1) se debe a la optimización de la recuperación del condensado y depende de la solubilidad de los compuestos condensados. En muchos casos, se formó una cantidad significativa de la materia carbonizada insoluble.

El tiempo del contacto del disolvente con el condensado, formado en el tubo del reactor, depende de la solubilidad del compuesto analizado y de otros compuestos del condensado y es diferente para los condensados. Por ejemplo, en el caso del condensado de la glicina el tiempo fue más corto que para la valina. Este tiempo depende también de la temperatura de la pirólisis utilizada. Mientras la temperatura es más alta, se obtiene la cantidad más elevada de la materia insoluble carbonizada en las paredes del tubo del reactor, la cual hace el proceso de disolución del sublimado más difícil. Para optimizar el proceso se utilizó la agitación del reactor con el disolvente y en algunos casos un calentamiento ligero

Para el análisis cualitativo (CG/EITF/EM) de los productos de las transformaciones térmicas de poli-aminoácidos y los aminoácidos valina y leucina en presencia de silicagel, los sublimados obtenidos en el experimento de la pirólisis se sometieron a una extracción con cloroformo. El reactor con el sublimado se lavó con 5 mL de cloroformo; la solución resultante se evaporó hasta tener un volumen de 1 mL.

4.3.5. Condiciones cromatográficas (HPLC)

Después de ajustar el volumen a 100mL con el disolvente correspondiente, la muestra se analizó por cromatografía de líquidos (HPLC), utilizando un detector UV a longitud de onda de 200 nm para los aminoácidos y 260 nm para las bases de los ácidos nucleicos. El flujo de la fase móvil fue de 1 o 2 ml min⁻¹ para diferentes compuestos (Tabla 5); la temperatura de la columna fue de 45°C

Como fase móvil se utilizaron las siguientes soluciones:

- a) agua doblemente destilada y desionizada (H₂O) para una elución isocrática en el caso de Gly, Ala, β-Ala y Aib;
- c) 0.1% solución acuosa de ácido trifluoroacético para la elución isocrática en el caso de bases de los ácidos nucleicos y Glu;
- c) una mezcla de H₂O-metanol 80:20 (v/v) para la elución isocrática de Pro;
- d) una solución acuosa (0.1%) de ácido trifluoroacético (TFA)-metanol 80:20 (v/v) para la elución isocrática de Phe;
- e) el gradiente de H₂O-metanol de 0% a 100% de metanol a 20 minutos en el caso de Val. y de 0% a 100% de metanol en 10 minutos para el caso de Leu.

Las otras condiciones (tiempos de retención de los compuestos y las PD correspondientes para los aminoácidos, longitudes de las columnas y las velocidades de flujo de la fase móvil) para los compuestos analizados se muestran en la Tabla 5.

4.3.6. Condiciones experimentales de CG/EITF/EM

El espectrómetro de masas funciona por impacto electrónico con electrones energizados a 70 eV. La resolución de este instrumento es 1uma y su intervalo espectral es de 10 a 2000 m/z. El detector de infrarrojo tiene una resolución espectral de 4 números de onda y un intervalo espectral de 4000 a 500 cm⁻¹

Tabla 5. Condiciones cromatográficas de los análisis

Compuesto	Tiempo de retención del compuesto, min.	Tiempo de retención de la PD correspondiente, min.	Fase móvil	Longitud de la columna, mm	Velocidad del flujo (mL/min)
Ilicina	1.3	1.6	H ₂ O	250	1
Ilanina	1.28	2.58+2.82	H ₂ O	250	1
Ialana	0.3	6.7+9.0	Gradiente de 100% H ₂ O a 100% MeOH en 20min.	100	1
Iucina	0.35	4.76-5.39	Gradiente de 100% H ₂ O a 100% MeOH en 10min	100	1
Irolina	2.0	6.8	H ₂ O:MeOH (80:20) (v/v)	250	2
ácido 2-aminoisobutírico	1.3	2.3	H ₂ O	250	1
Ienilalanina	2.8	-----	0.1% TFA en H ₂ O MeOH (80:20)	250	2
ácido glutámico	1.3	1.8 (ac piroglutámico)	0.1% TFA en H ₂ O	250	1
Iadenina	2.1		H ₂ O	250	2
Iracil	2.0		H ₂ O	250	2
Iitosina	1.61		0.1% TFA en H ₂ O	250	1

Para lograr una separación óptima de los compuestos orgánicos formados se utilizó una rampa de temperatura de 55°C a 250°C con aumento de 7°C min⁻¹. Se utilizó el helio como gas acarreador con un flujo de 1 ml min⁻¹.

La temperatura de la celda del detector de infrarrojo fue de 250°C. La temperatura de las interfases, que conectan al cromatógrafo de gases con el espectrómetro de masas y con el detector de infrarrojo también fue de 250°C

La identificación de las especies orgánicas formadas se realizó a través de los espectros de masas e infrarrojo registrados por los instrumentos. Además de una cuidadosa interpretación, los espectros se compararon con las muestras estándar en el caso de dicetopiperazinas y para otros compuestos contra los espectros de masas e infrarrojo de las bibliotecas electrónicas Wiley 138K y EPA-REVA, respectivamente. Los resultados de la búsqueda de los datos en las bibliotecas de EPA-REVA y Wiley 138K para los compuestos selectos se presentan en el Apéndice 7.3 (p.113-120).

4.3.7 Análisis cuantitativo y tratamiento estadístico de los resultados

A partir de concentraciones de las soluciones estándar y las áreas de los picos correspondientes en los cromatogramas se prepararon las curvas de calibración para los compuestos analizados y se aseguró la linealidad de las respuestas (lo que significa que la relación entre la concentración de compuesto en la solución analizada y el área del pico cromatográfico es lineal). El número de réplicas de cada análisis fue de tres para cada concentración, lo que permite asegurar la repetibilidad de los resultados. Los cromatogramas correspondientes se muestran en el Apéndice 7.1 (p.103-107).

El cromatógrafo utilizado para el presente estudio estaba equipado con un integrador electrónico que proporciona mediciones muy precisas de las áreas de los picos cromatográficos de los compuestos analizados. Los resultados de las áreas para las diferentes concentraciones de la glicina se muestran en la Tabla 6 y los resultados obtenidos después de la prólisis de la glicina y algunos otros compuestos (leucina, adenina, uracil y citosina) a temperaturas desde 400 a 1000°C se muestran en el Apéndice 7.2 (p 108-112). Las curvas de calibración para la glicina, la PD de glicina y de uracil se muestran en la Fig. 10.

Tabla 6. Resultados de calibración de la glicina y su PD, obtenidos por HPLC

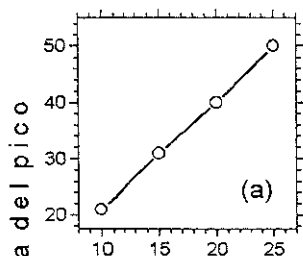
(y - Área del pico en el cromatograma, la cual se obtiene digitalmente;

Δy - promedio de área del pico en tres réplicas;

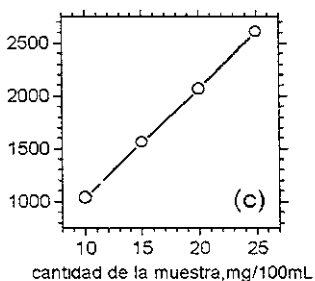
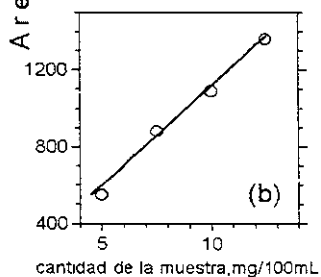
x - concentración en mg/100mL).

Glicina, x	y	Δy	PD, x _i	y _i	Δy_i
10	22	21	5	550	550
	20			548	
	21			552	
15	30	31	7.5	820	822
	33			824	
	30			822	

20	39	40	10	1091	1090
	40			1090	
	40			1088	
25	50	50	12.5	1354	1361
	49			1362	
	51			1366	



**Fig. 10. Gráficas de calibración;
Area de los picos entre cantidad de
la muestra en mg;
a) glicina (200nm);
b) la PD de glicina (200nm);
c) uracil (260nm).**



Las áreas bajo los picos en el cromatograma se utilizaron para calcular la concentración de los compuestos, comparando con una gráfica de las áreas de los picos en función de la concentración para cada uno de los compuestos. Para las PDs se tomó en cuenta que para la formación de una molécula de PD se necesitan dos moléculas del aminoácido padre menos dos moléculas del agua.

Las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas mediante el método de los mínimos cuadrados tienen la siguiente expresión algebraica:

$$y = mx + b,$$

Donde y - respuesta, área bajo la curva en el cromatograma de los compuestos;

m - pendiente de la recta de calibración;

x - concentración del compuesto;

b - es intercepto (el valor para y cuando x es cero) u ordenada al origen de la recta de calibración.

En la aplicación del método de los mínimos cuadrados, es necesario suponer que hay una relación lineal entre las áreas de los picos (y) y la concentración del compuesto (x). También se da por hecho que cualquier desviación de los puntos individuales respecto a una línea recta es consecuencia del error en la medición, es decir, se asume que los patrones se han preparado cuidadosamente, con lo cual los errores indeterminados en el proceso de preparación son despreciables comparados con los del proceso de medición (Tabla 7).

La desviación vertical de cada punto respecto de la recta se conoce como residual (Residual = y - mx + b). La línea que se deduce por el método de los mínimos cuadrados es aquella que minimiza la suma de los cuadrados de los residuales de todos los puntos. Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien a las rectas de calibración, se calculó el coeficiente de correlación, (r) que está dado por:

$$r = \frac{\sum \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum (x_i - \bar{x})^2] [\sum (y_i - \bar{y})^2]\}^{0.5}}$$

La línea de la recta de regresión no es la misma recta que la de calibración (excepto en el caso donde todos los puntos caigan sobre una línea recta, exactamente cuando r = 0), se calculó basándose en el principio que la línea debe pasar por el "centro de gravedad" de los puntos (\bar{x} , \bar{y}):

$$(m) = \frac{\sum \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \bar{y} - m \bar{x}$$

La recta de regresión se utilizó para estimar la concentración de las muestras problema y el límite de detección del procedimiento analítico. Primero se calculó el dato estadístico $S_{y/x}$:

$$S_{y/x} = \{\Sigma (y_i - \hat{y}_i)^2 / n-2\}^{0.5},$$

En donde \hat{y}_i es valor de los puntos sobre la recta de regresión calculada, el cual se calcula a partir de la ecuación de regresión.

Una vez determinadas la pendiente y la ordenada de origen de la recta de regresión es fácil calcular un valor de x correspondiente a cualquier valor de y medido.

Es importante evitar la confusión entre el límite de detección de una técnica con su sensibilidad. La sensibilidad de una técnica se define como la pendiente de una línea de calibración y, siempre que la representación sea lineal, puede ser medida en cualquier punto de ella. El límite de detección es la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B ($y_B = b$), más dos veces la desviación estándar del blanco, S_B ($S_B = S_{y/x}$). El valor de (y') en el límite de detección está dado por: $y' = y_B + 3S_B$

El límite (y'') de cuantificación ("límite de determinación"), considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativas precisas tiene el valor: $y'' = y_B + 10S_B$. Los resultados estadísticos para los compuestos cuantificados en este trabajo se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados estadísticos para los compuestos analizados cuantitativamente

Compuesto	Ordenada de origen (b)	Pendiente (m)	Coficiente de correlación	Límite de detección, (mg/100mL)	Límite de cuantificación, (mg/100mL)	Intervalo estudiado (mg/100mL)
Glicina y	1.90	1.92	0.999	0.49	1.65	10-25
PD	7.50	108.40	0.999	0.05	0.17	5-12.5
Alanina y	3.90	2.32	0.999	1.40	4.52	1-25
PD	-63.60	60.72	0.997	1.80	6.11	1-25
β -Alanina	2.00	2.97	0.999	2.16	7.20	1-50
Valina y	-4.30	2.26	0.998	2.12	7.07	1-25
PD	-201	76.7	0.996	2.20	7.35	1-25
Leucina y	-7.00	7.20	0.995	2.50	8.20	1-25
PD	-337.80	69.26	0.997	1.70	5.80	1-25
Prolina y	0.4	0.48	0.999	1.00	3.34	1-50
PD	8.75	210.77	0.999	0.61	2.03	1-50

Acido 2-aminoisobutirico y PD	1.50	2.16	0.999	1.06	3.50	1-25
	-116.20	83.84	0.999	1.22	4.10	1-25
Fenilalanina	-1.5	1.58	0.999	1.92	6.45	1-50
Acido glutámico y piroglutámico	4.75	10.37	0.999	0.45	4.50	1-50
	-66.75	48.03	0.999	2.11	7.05	1-50
Adenina	50.20	117.41	0.999	0.73	2.40	5-125
Uracil	-8.80	104.36	0.999	0.38	1.28	10-25
Citosina	-30.45	75.54	0.999	0.38	1.28	1-25

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. *Secuencia de análisis del sublimado y de identificación*

La etapa más importante de esta investigación consistió en la pirólisis de los compuestos a estudiar, cuyo efecto simula el calentamiento de los compuestos durante el pasaje atmosférico y la entrada a la superficie de la Tierra Primitiva de los compuestos orgánicos. La segunda etapa consistió en el análisis de los compuestos, los cuales sobrevivieron durante el calentamiento y de los productos, resultados de estos compuestos y recuperados del sublimado. La secuencia de análisis del sublimado y de la identificación de los productos se muestra en la Fig 11

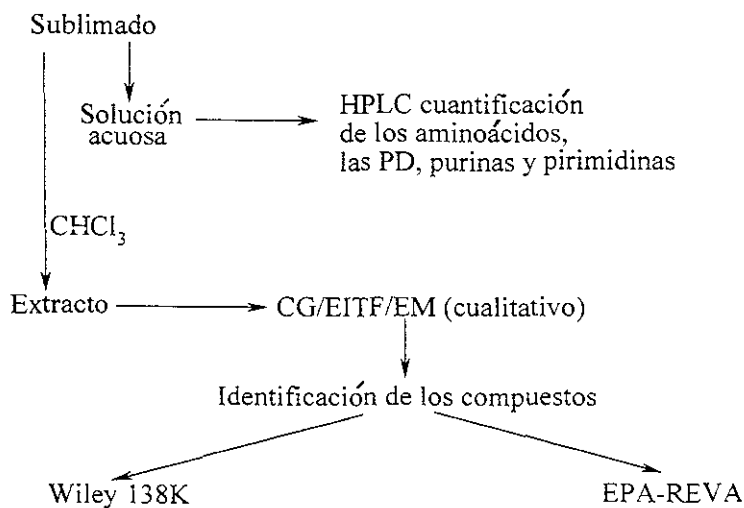


Fig. 11. Secuencia de análisis del sublimado y de identificación

La eliminación del humo durante la pirólisis dependía de la temperatura: por ejemplo, si el proceso de la pirólisis se realizaba a 400°C se requería esperar 10 minutos para eliminar totalmente el humo y la muestra permanecía por 20 minutos en el horno para alcanzar el equilibrio del sistema. En el caso de los experimentos a temperaturas entre 500 a 1000°C únicamente se requerían 6 minutos para equilibrar el sistema. Los productos volátiles de descomposición con bajo peso molecular se eliminaban con el flujo continuo de N₂ o CO₂.

Los experimentos de la pirólisis no se repetían, tomando en cuenta la larga duración de los experimentos, su laboriosidad y la peligrosidad. Sin embargo, para el uracilo, se hicieron tres réplicas de la pirólisis a todas las temperaturas estudiadas (Fig 12) para confirmar la reproducibilidad de los experimentos pirolíticos. La reproducibilidad de los datos obtenidos después de la pirólisis y cromatografía de líquidos (HPLC) es bastante alta. Los errores de medición son menores de 2.5% (0.3% a temperatura de 400°C, 1.8% a 500°C, 2.3% a 600°C y 1.6% a 700°C), lo que se considera razonable para los estudios analíticos.

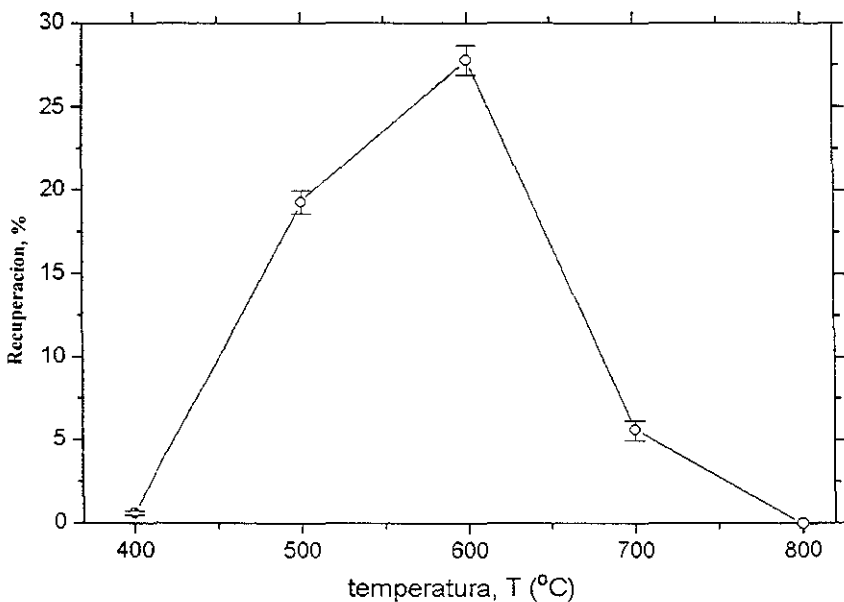


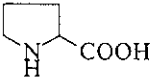
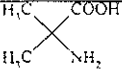
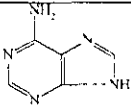
Fig. 12. Recuperación de uracilo a temperaturas (T) de 400 a 800°C y la reproducibilidad de los resultados

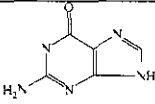
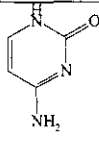
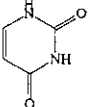
5.1.1. Optimización de la recuperación de muestra

Para la recuperación completa de la muestra se necesita saber la solubilidad de los aminoácidos y las bases de los ácidos nucleicos en diferentes disolventes (Tabla 8). En la base de estos datos se escogió empíricamente a los disolventes, los cuales permiten la disolución completa del condensado. Por ejemplo, el agua se utilizó para los compuestos Gly, Ala, β -Ala y Glu, los cuales se disuelven fácilmente a temperatura ambiente; para Aib, Pro, Phe, Val, Lcu, uracil y adenina se

utilizó una mezcla H₂O/MeOH 1.1; para la citosina se utilizó 0.1% solución acuosa de TFA. Se tomó en cuenta la solubilidad de las PDs correspondientes, la cual es más baja que la de los aminoácidos correspondientes. Por ejemplo, las PDs de la valina y leucina son hidrófobos, entonces para disolver las PDs juntos con los aminoácidos correspondientes (relativamente hidrófilos) en la misma muestra, hay que hacer un disolvente adecuado, escogido empíricamente. Para la guanina no se muestra el cromatograma, ya que este compuesto no se disuelve en los disolventes comunes y además, su comportamiento durante la pirólisis es diferente de otros compuestos estudiados (sección 5.3).

Tabla 8. Los aminoácidos y las bases de los ácidos nucleicos estudiados y sus solubilidades en diferentes disolventes

Compuesto	Fórmula	Solubilidad
Glicina	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	En 100mL del agua a 25°C se disuelve 25 g, en 100 g de alcohol abs. -0.06 g; insoluble en éter
β-alanina	$(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	Fácilmente en agua, poco en alc., insoluble en éter y acetona
Alanina	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	En 100 mL del agua a 25°C se disuelve 166.5 g; insoluble en éter
Valina	$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	En 100 mL del agua a 25°C se disuelve 88.5 g, insoluble en disolventes neutros comunes
Leucina	$(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	En 100 mL del agua a 25°C se disuelve 24.26 g, en 99% alcohol 0.72g/l, insoluble en éter
Acido glutámico	$\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	8.64 g/l a 0°C en agua, insoluble en etanol, metanol, éter, acetona y disolv. neutr. Comunes
Fenilalanina	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	En agua 29.6 g/l a 25°C, fácil en etanol y metanol
Prolina		En agua 162.3 g/l a 25°C; en alcohol 1.55% a 35°C, insoluble en éter, butanol, isopropanol
Acido α-aminoisobutírico		Fácil en agua, difícil en alc., insol. en éter
Adenina		1g se disuelve en 2000 mL del agua fría y en 400 mL del agua hirviendo, soluble en alc., insoluble en éter y cloroformo

Guanina		Fácil en NH_4OH , solución acuosa de KOH , difícil en alc.; casi insoluble en agua
Citosina		1g se disuelve en 130 mL del agua, poco soluble en alcoholes, insoluble en éter
Uracilo		Fácil en agua caliente, a 25°C se disuelve 0.358 partes en 100 partes del agua, casi insol. en alc., éster, soluble en NH_4OH

5.1.2. Optimización de las condiciones para HPLC

Los estudios cuantitativos se realizaron por HPLC tomando en consideración los tiempos de retención de los estándares respectivos. Los intervalos de concentración de los estándares para los compuestos analizados se mantuvieron alrededor de 50mg/100mL (lo que equivale a 10% de recuperación de los compuestos pirolyzados) y 0.5mg/100mL (igual a 0.1% de recuperación). Los resultados menores de 0.1% se igualaron a cero.

El uso de diferentes disolventes se debe a las propiedades de los aminoácidos y las bases de ácidos nucleicos (Tabla 8). Es importante, tomar en cuenta la solubilidad tanto para la recuperación completa del sublimado, como para optimización de HPLC para los compuestos con diferentes propiedades físico-químicas. Otro parámetro importante es la polaridad de la fase móvil. Los compuestos analizados por HPLC en fase inversa aparecen en el cromatograma en orden de disminución de la polaridad. Primero aparecen los picos de los compuestos más polares y después los menos polares, en el siguiente orden general: alcoholes, aminas, amidas, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y finalmente hidrocarburos.

Para obtener una buena separación en un tiempo razonable, las polaridades de la muestra, de la fase móvil y de la fase estacionaria se han de armonizar cuidadosamente. Una vez escogida la fase estacionaria (en todos los casos es C_{18}), se realizó una serie de pruebas obteniendo los cromatogramas con varias fases móviles hasta que se llegó a una separación satisfactoria para cada uno de los compuestos. En el caso del radical más grande del compuesto a analizar [R-

$\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$] se necesita la proporción más grande del disolvente menos polar que el agua en la fase móvil, lo que disminuye el tiempo de retención del compuesto. La explicación del efecto de la fuerza del disolvente sobre los factores de capacidad se encuentra en la sección 1.1.4. Para los disolventes que fueron utilizados en el presente estudio, k' de metanol es 5.1; del agua es 10.2 y del ácido trifluoroacético es <2. Utilizando las fórmulas (sección 1.1.4), se encontró la mejor manera para una separación adecuada. Por ejemplo, para las PD de valina y leucina, las cuales son muy poco solubles en agua, se necesita un gradiente del agua con metanol. Así, para obtener el tiempo de retención de la PD de 6.75 min, la fracción de metanol en la fase móvil debe llegar a 32.5% con el uso de gradiente. La solución acuosa de ácido trifluoroacético de 0.1% se utilizó para la elución isocrática del ácido glutámico y de las bases de los ácidos nucleicos, los cuales son poco solubles en agua y en la mayoría de los disolventes neutros. Con el uso de TFA se mejoró notoriamente la forma de los picos.

El uso de las columnas cromatográficas (HPLC) de longitud diferente (10.0 y 25.0 cm) también está relacionado con la optimización. Cuando se analizan los compuestos muy hidrófobos (como las PDs de valina y leucina) los cuales tienen un tiempo de retención grande, es mejor utilizar las columnas más cortas para lograr una elución más rápida (las PDs de Val y Leu, disueltos en el agua, tardaban más de 1 hora en salir en el cromatograma). Al mismo tiempo, para los compuestos hidrófilos (como glicina, los ácidos glutámico y piroglutámico), los cuales eluyen muy rápido de las columnas cortas, el uso de las columnas de 25.0 cm mejora la resolución del cromatograma, aumentando el factor de capacidad k' de los compuestos a analizar.

El uso de estándares de las diferentes PDs [ciclo-(L-Ala)₂ y ciclo-(DL-Ala)₂, etc.] se necesitó para la identificación de los picos en el cromatograma, debido a que la sublimación provoca la racemización de las PDs y la aparición de los dos picos de los diastereoisómeros de PDs en el cromatograma. Sin embargo, para cuantificar la cantidad de las PD obtenidas, las áreas de los picos correspondientes se sumaron.

5.1.3. Condiciones para CG/EITF/EM

El análisis cualitativo se realizó mediante cromatografía de gases acoplada con EITF y EM. El número de réplicas fue tres para todos los análisis, donde se utilizó esta técnica. Dentro de estos análisis, generalmente, se conservó la cantidad y la calidad de los picos cromatográficos. Analizando entre las tres réplicas, se escogió un cromatograma, el cual permitió analizar por

espectrometría de masas y espectroscopía de infrarrojo el mayor número posible de los picos con la mejor resolución. Los estándares que fueron utilizados para este método fueron las PD (sección 4.2)

La columna Ultra 1 para la cromatografía de gases se seleccionó por la excelente facilidad con que separa compuestos volátiles polares y no polares, su alta capacidad de retención, su gran estabilidad química y carácter hidrófobo y también por el grado mínimo de sangrado que presenta a temperaturas de alrededor de 250°C. De acuerdo con los estudios realizados por Basiuk (1998), Basiuk y sus colaboradores (1998a-c) este tipo de columna es la más adecuada para la separación de diferentes clases de los compuestos desconocidos con pesos moleculares y las fórmulas moleculares diferentes, los cuales se producen después de la pirólisis de los aminoácidos.

Al igual que en la cromatografía de líquidos, para la optimización de la cromatografía de gases se tomó en cuenta la solubilidad de los compuestos en cloroformo. Por ejemplo, en el trabajo de Basiuk y colaboradores (1998a), se utilizó un gradiente uniforme de agua - metanol de concentración de 0% a 100% en 30 minutos para el análisis por HPLC del sublimado de Aib y Ala y el mismo gradiente en 40 minutos para Val y Leu; en estas condiciones no se encontraron las evidencias de las amidinas bicíclicas. Por otro lado, en la fracción disuelta en cloroformo y analizada por CG/EITF/EM se identificaron los productos con peso molecular grande, como las PD, las amidinas bi- y tricíclicas. Este hecho permitió escoger el cloroformo para disolver el sublimado para el presente estudio, como el disolvente eficaz para disolución de los compuestos a analizar con el peso molecular elevado.

Sin embargo, es difícil de recuperar todos los compuestos del sublimado obtenidos después de la pirólisis. Así, después de disolver los compuestos en cloroformo para el análisis cualitativo (CG/EITF/EM) de poli-aminoácidos en la solución acuosa, analizada por HPLC (Basiuk et al., 1998a), todavía se observó la presencia de las PD de la glicina (en cantidad de 2.8%) y alanina (0.4%). Sin embargo, para las soluciones en cloroformo, esto no perjudica los resultados del análisis cualitativo de los productos de la pirólisis.

Para lograr la separación cromatográfica de todos los productos durante un tiempo razonable, se utilizó un gradiente de temperatura de 55 a 250°C con aumento de 7°C min⁻¹, lo que permitió terminar el análisis en menos de 40 minutos. El aumento del tiempo de análisis por más de 40 min necesita más de 30 MB de memoria del disco duro para adquirir los archivos espectrales. Ya que la computadora acoplada con el equipo tiene capacidad limitada, esto resulta en fallas con pérdida de

datos. Además, el aumento del tiempo del análisis empeora la calidad de los datos espectrales, cruciales para la identificación de los compuestos desconocidos. Por otro lado, la disminución del tiempo de análisis mediante el incremento de temperatura, disminuye la resolución cromatográfica.

Una observación cuidadosa de los **cromatogramas** puede ayudar en la identificación de los compuestos. Los picos cromatográficos presentan tiempos de retención mayores al aumentar su número de átomos de carbono. Los compuestos alifáticos más ramificados eluyen antes que los menos ramificados. En general, los compuestos aromáticos presentan los mayores tiempos de retención, debido a que los productos con mayor peso molecular tienen mayor afinidad por la fase estacionaria, causada por la similitud de la naturaleza química entre ambos.

El uso de la **energía de 70 eV** para la espectrometría de masas por impacto electrónico permite esperar varios tipos de rupturas en los compuestos a analizar, debido a que esta energía es como mínimo tres ordenes de magnitud superior a la necesaria para romper los enlaces químicos típicos. Por eso, para cierto tipo de moléculas, la fragmentación es tan efectiva que no se queda ningún ion molecular y, por lo tanto, la información más importante para la determinación del peso molecular se pierde. Esto sucede para varios compuestos analizados, sobre todo para los hidrocarburos con peso molecular elevado.

Al aumentar el número de carbonos en una molécula, su **espectro de masas** se va complicando. El patrón de fragmentación de los *hidrocarburos con cadenas lineales* saturadas de cuatro o más átomos de carbono se caracteriza por la presencia de grupos de picos separados por 14 unidades de masa distribuidos alrededor de los picos de m/z 43 y 57, los cuales son en la mayoría de los casos, los de mayor intensidad. Se nota que al aumentar el peso molecular, la intensidad del pico del ion molecular disminuye. Los espectros de masas de los hidrocarburos saturados ramificados son similares a los espectros de los hidrocarburos de cadena lineal pero presentan características adicionales. A medida que el número de ramificaciones es mayor, el ion molecular puede no aparecer. En estos casos el pico que aparece a la mayor relación m/z debe corresponder a un fragmento de la molécula que sea el producto de una pérdida lógica como 15, 29 o 43 unidades que corresponderían a la pérdida de los fragmentos como CH_3 , C_2H_5 ó C_3H_7 , además, de la fragmentación ocasionada por el rompimiento del enlace en la posición en que se encuentra la ramificación. Este rompimiento ocurre con mayor facilidad cuando el átomo de carbono está más sustituido y siempre el sustituyente de mayor masa es el que preferentemente se elimina como un radical o una molécula neutra, en muchas ocasiones corresponde al pico base o a uno de los picos

más abundantes del espectro. Respecto a los *compuestos insaturados*, el ion molecular del espectro de masas es de mayor intensidad que el del correspondiente alcano por que el catión radical involucra a los electrones de la doble ligadura, lo cual incrementa su estabilidad. En este tipo de compuestos, la ruptura que predomina es alílica perdiéndose, al igual que en el caso anterior, el fragmento de mayor masa.

En los *compuestos aromáticos* la presencia del anillo hace al ion molecular estable y provoca que este, generalmente, se presente como el pico base. Los compuestos aromáticos presentan un pico de m/z 91 ($C_6H_5CH_2^+$) originado por la ruptura del enlace en la posición β respecto al anillo. Este ion experimenta una reorganización y origina al ion tropylium ($C_7H_7^+$), el cual, a su vez, se transforma al ion de m/z 65, observado en los espectros de los compuestos aromáticos tras la pérdida de acetileno ($CH\equiv CH$).

En los *bencenos monoalquilsustituídos* un grupo de iones característicos son originados por la ruptura orto al anillo seguida de la migración de un hidrógeno, lo que da lugar a los picos m/z 77, 78 y 79. Con cadenas hidrocarbonadas de más de cuatro átomos de carbono, el pico base de m/z 41 es resultante de una reordenación de McLafferty que sufre la molécula.

En los espectros de los *ácidos carboxílicos* los iones moleculares son diferentes y su abundancia aumenta con el aumento del peso molecular. El pico ($M-OH^+$) es diagnóstico para los ácidos insaturados. La pérdida de CO_2 se observa en los espectros de *ácidos dicarboxílicos y sustituidos*, la cual sucede durante la decarboxilación térmica. Los ácidos alifáticos dicarboxílicos también se caracterizan por los iones m/z 36 ($H_4O_2^+$) y 46 ($CH_2O_2^+$). Los *ácidos carboxílicos aromáticos* presentan en sus espectros la pérdida de OH seguida por la pérdida del CO. El hidrógeno en el orto-sustituyente produce el pico abundante ($M-H_2O^+$) por el efecto "orto", el cual sigue de la pérdida de CO.

En el espectro de las *lactonas y anhídridos* se presenta el pico m/z 56 debido a la pérdida de ($C_2H_4CO^+$) y m/z 44 (CO_2).

En las *aminas alifáticas* el ion molecular es de muy baja abundancia o puede no aparecer. Esto se debe al efecto del grupo amino como el iniciador de la reacción de ruptura. Por la alta afinidad de las aminas a sufrir una protonación, se producen los iones estables de MH^+ , los cuales proporcionan la información sobre el peso molecular. En las *aminas aromáticas* el pico base se produce por la pérdida del grupo alquilo debido a la ruptura α . En los n-alquilaminas primarias se presenta el pico m/z 86 ($C_5H_9NH_2^+$) debido a la reacción de sustitución, en aminas secundarias m/z

44 debido al ion $(\text{CH}_2=\text{NH}-\text{CH}_3^+)$ y en las aminas terciarias el mismo ion por el grupo $(+[\text{HN}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2])$.

Los espectros de masas de las *amidas primarias* se parecen a los espectros de los ácidos y ésteres correspondientes. En las amidas secundarias el nitrógeno juega el papel del iniciador de la reacción de la ruptura. Los iones moleculares más frecuentes son MH^+ debidos a las reacciones entre el ion y la molécula. Los iones que contienen el nitrógeno producen los picos m/z 59, 73, 87, etc. Y las pérdidas de los grupos alquilo producen los picos m/z 44, 58, 72, 86; para las cadenas más largas los iones más abundantes corresponden a $(\text{CH}_2)_4 - m/z$ 72, 128, 187 y 240. Los picos que corresponden a la pérdida de los hidrocarburos, como $(\text{C}_n\text{H}_{2n+1}^+)$ y $(\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+)$ son menos abundantes. Los espectros de las *amidas secundarias y terciarias* muestran los resultados de las reacciones adicionales como la ruptura β de la unión de N-R con la reordenación de uno o dos átomos de hidrógeno (m/z 60; debido a la pérdida de NHCO y H_2). Las amidas terciarias tienen una reordenación en ambos lados de la cadena, la cual produce los picos $(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8^+)$, $(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}_2\text{H}_3^+)$, $(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}_4\text{H}_4^+)$, y $(\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8-\text{C}_2\text{H}_3-\text{C}_2\text{H}_4^+)$, los que corresponden a m/z 115, 88, 87 y 60, respectivamente. La ruptura α inducida por el nitrógeno produce iones de $(\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5^+)$ y $(\text{M}-\text{CH}_3^+)$, los cuales se descomponen por la eliminación de las cetenas y la reordenación del hidrógeno $[\text{+H}_2\text{N}=\text{CHCH}_3]$ (m/z 44) y $[\text{+H}_2\text{N}=\text{CHC}_2\text{H}_5]$ (m/z 58) La pérdida de cetenas representa una ruta de descomposición importante en acetamidas. Para los N-arilacetamidas la reordenación del hidrógeno con la migración de la carga del grupo amido ocurre solamente cuando el ion resultante $(\text{M}-\text{RCONHR}'^+)$ es estabilizado y el radical R es pequeño. La ruptura de la unión C-N con la obtención del ion alcanilo (CH_3CO^+) es más reducida que en el caso de los ésteres. Esta ruptura, normalmente es menos favorecida en las amidas secundarias (m/z 77), siendo lo contrario en las amidas terciarias (m/z 156).

En el espectro de los *nitrilos alifáticos* las rupturas mayores son más difíciles para la interpretación que para otros compuestos simples. Las series de iones más importantes son $(\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{N}^+)$, $(\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{N}^+)$ y las series de iones comunes de los hidrocarburos son: $[\text{C}_n\text{H}_{2n-1}^+]$ (m/z 27, 41, 55, ...) y $[\text{C}_n\text{H}_{2n-2}^+]$ (m/z 26, 40, 54, ...). Los picos de iones moleculares son débiles o pueden no aparecer, a pesar de que ellos son fuertes para los nitrilos aromáticos. Afortunadamente, los nitrilos alifáticos forman el pico MH^+ por la reacción "ion-molécula". Las series de iones m/z 40, 54, 68, 82, para $(\text{CH}_2)_n\text{CN}^+$ dominan la porción más baja del espectro de masas; las series que corresponden a la reordenación del hidrógeno, $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}\text{N}^+$ (m/z 41, 55, 69, 83,) tienen mayor

importancia para $n \sim 3$ hasta 6. Los *nitrilos insaturados y aromáticos* tienen los iones moleculares más abundantes, y los iones (M-H)⁺ por la ausencia del α -hidrógeno no son abundantes

En todos los casos, reuniendo los fragmentos con los que se justifican los picos del espectro de masas, se puede proponer una estructura química.

La información que proporciona la espectrometría de masas permite conocer el peso molecular del compuesto analizado y la **espectroscopia de infrarrojo** permite conocer los grupos funcionales que forman cada uno de los compuestos. Esta información vista en conjunto, ayuda a elucidar la estructura molecular del compuesto analizado. Teniendo en cuenta que en presente trabajo los productos de la pirólisis contienen grupos carbonílicos y carboxílicos, especial atención se prestó a los máximos de banda de $\nu_{C=O}$ y formas en los espectros de infrarrojo. Estas bandas son muy sensibles a la presencia de otros sustituyentes, así como para estimar el tamaño de los sustituyentes en el caso de compuestos cíclicos. También los espectros de los nitrilos se caracterizan por tener una absorción de mediana o poca intensidad, originadas principalmente por las vibraciones de alargamiento del enlace $C\equiv N$.

En la tabla 9 se recopilan los intervalos de absorción, en base de los cuales se realizaron las asignaciones de los grupos químicos característicos de los compuestos producidos en este estudio. La información que proporciona el espectro en el infrarrojo por sí sola no es suficiente para elucidar la estructura química de un compuesto. Es difícil diferenciar entre moléculas de los compuestos que pertenecen a una misma familia debido a que los números de onda, en que se presentan las bandas de absorción de los diferentes grupos químicos, son muy parecidos y las bandas se sobreponen frecuentemente. Esto es lo que sucede con la absorción de los grupos metilo y metileno, presentes en los espectros de muchos compuestos analizados en este estudio. Pero la identificación de las absorciones características de grupos químicos específicos es la tarea más sencilla. Conjuntando esta información con la proporcionada por los espectros de masas y comparándola con aquella que se obtiene de las bibliotecas electrónicas, puede garantizarse que la estructura química propuesta para un compuesto determinado es acertada.

Para el presente estudio las diferencias de los espectros obtenidos experimentalmente con los de las bibliotecas aparecen por varias razones, principalmente se debe al uso de los diferentes aparatos y temperaturas de análisis. Infiuye también que para obtener los espectros de los compuestos de las bibliotecas se utilizan los compuestos de alta pureza y en el trabajo presente los compuestos que se analizaron, fueron separados por cromatografía de gases

Tabla 9. Regiones de absorción características de las vibraciones de algunos grupos químicos específicos

Enlace	Tipo de compuesto	Intervalo de frecuencias, cm⁻¹
C-H	Alcanos	2850-2970; 1340-1470
=C-H	Alquenos	3010-3095; 675-995
C-H	Alquinos (=C-H)	3300; 1125-1375, 890-970; 575-695
C-H	Anillos aromáticos	3010-3100; 690-900
N-H	Aminas, amidas	3300-3500
C=C	Alquenos	1610-1680
C=C	Anillos aromáticos	1500-1600
C≡C	Alquinos	2110-2260; 610-700
C-N	Aminas, amidas	1180-1360
C≡N	Nitrilos	2210 2280; 580-525
C-O	Alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres	1050-1300
C=O	Aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres	1690-1760
NO ₂	Nitrocompuestos	1500-1570; 1300-1370

5.2. Pirólisis de aminoácidos

5.2.1. Recuperación de los aminoácidos

La recuperación de los aminoácidos a temperaturas por arriba de 400°C en los experimentos realizados en atmósfera de nitrógeno, se presenta en la Figura 13. (Los valores más bajos de 0.1% se igualaron a cero).

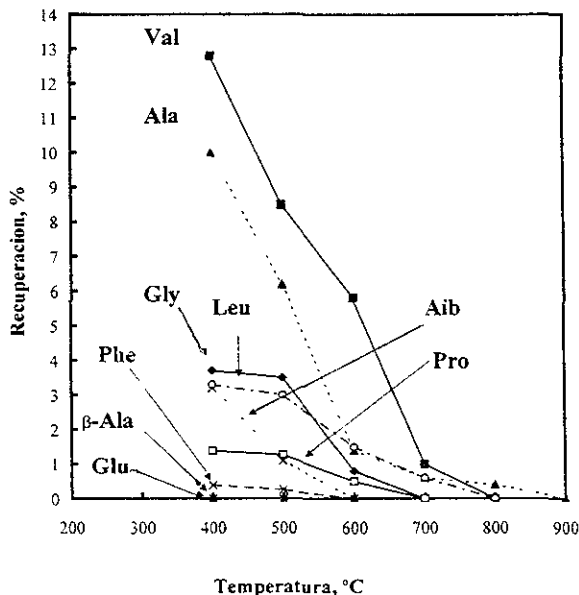


Fig. 13. Recuperación de los aminoácidos en función de la temperatura de pirólisis.

En todos los casos la recuperación disminuyó con el aumento de la temperatura. A la temperatura de 400°C los valores para alanina y valina están en niveles de 10 y 13 % respectivamente, de 3-4 % para glicina, ácido α -aminoisobutírico y leucina, y los más bajos de 1.5% para prolina y fenilalanina. El ácido-L-glutámico y la β -alanina se descomponen totalmente a temperatura de 400°C. Para glicina, prolina, leucina y fenilalanina la diferencia entre la recuperación a temperaturas de 400 y 500°C no es significativa, sin embargo, en el caso de alanina, ácido α -aminoisobutírico y valina los valores disminuyen significativamente (para Aib casi a la mitad)

El aumento de la temperatura a 600°C resulta en la descomposición completa del ácido α -aminoisobutírico y la fenilalanina siendo estos los compuestos menos estables. Los aminoácidos glicina y prolina se descomponen totalmente a 700°C; valina y leucina no se detectan después de 800°C y alanina a esta temperatura muestra 0.4% de la recuperación resultando ser el más estable de todos los aminoácidos estudiados.

5.2.2. Producción de dicetopiperazinas (PDs)

Para los aminoácidos Gly, Ala, Aib, Val, Leu y Pro también fueron analizados los rendimientos de las PDs como productos de la condensación térmica y una posterior deshidratación térmica. Los resultados están en la Figura 14. β -Alanina, como todos los β -aminoácidos, no puede formar moléculas de PD; para la fenilalanina y ácido glutámico no fue posible contar con los compuestos estándar de las PDs. El ácido glutámico forma más fácilmente al ácido piroglutámico (por deshidratación intramolecular), que puede tener las mismas implicaciones para la química prebiótica que la formación de las PDs; el ácido piroglutámico regenera a la materia prima en las condiciones de hidrólisis. En el caso de los aminoácidos ópticamente activos (Ala, Val, Leu y Pro, usados en los experimentos en la forma de los L-enantiómeros) las PDs se detectan en forma de mezclas de diaestereoisómeros, debido a su racemización a las altas temperaturas.

El valor de producción más grande de la PD lo presenta la Pro a 400°C que es alrededor de 80%. El valor correspondiente para el derivado de Ala es considerablemente más bajo (48%), pero más grande, que para todas las demás PDs y el ácido piroglutámico. Es interesante comparar la producción de las PDs con la recuperación de los aminoácidos. Para una comparación de la recuperación de los aminoácidos y de los rendimientos de sus productos de condensación, los resultados de experimentos de pirólisis se presentan en forma de gráficas individuales para cada aminoácido en la Figura 15.

Como se esperaba, los rendimientos considerables de las PDs en ocasiones superan a los valores de la recuperación de los aminoácidos (Fig. 15), en particular para Gly, Ala y Pro. Esto se explica fácilmente para la Gly, que no tiene ningún sustituyente alquílico en su molécula, así que el impedimento estérico del sustituyente durante la ciclodimerización es insignificante. La Ala, que posee el sustituyente pequeño (CH_3), muestra propiedades similares. Pero si un α -sustituyente es grande, esta situación cambia; en el caso de Val la recuperación del aminoácido es notablemente mayor que los rendimientos de la PD en el mismo intervalo de temperatura; En el caso de la Gly, la

PD desaparece alrededor de 900°C, mientras que el aminoácido se descompone completamente a 700°C. En los casos del Aib, Pro y Glu se observa una situación similar. Para Val y Leu los aminoácidos son más estables que las PDs correspondientes. Ala representa un caso intermedio, donde los dos compuestos analizados no se detectan después de 800°C.

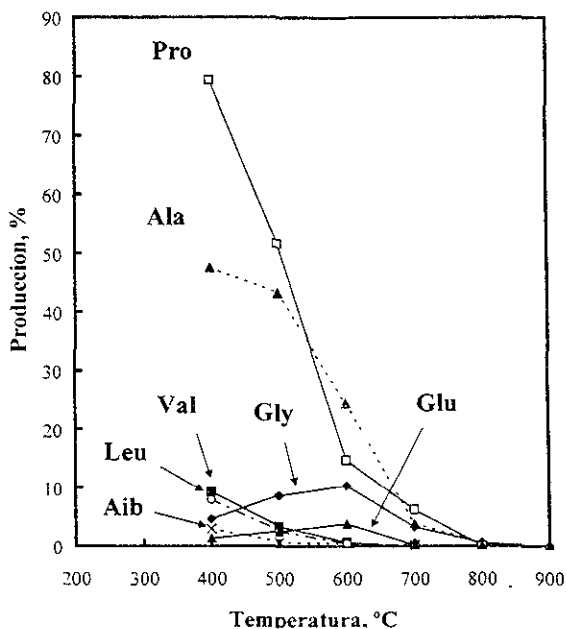


Fig. 14. Producción de las PDs (para Gly, Ala, Aib, Val, Leu y Pro) y del ácido piroglutámico (para Glu) en función de la temperatura de pirólisis.

el Aib y la Leu representan los casos intermedios, donde estos valores son comparables. El comportamiento térmico de Pro fue inesperado: a pesar de que su sustituyente α es grande y directamente conectado con el átomo de nitrógeno (que lógicamente debe de causar las obstrucciones adicionales durante la ciclodimerización a ciclo-Pro₂), la pirólisis produce la PD en rendimientos 1-1.5 ordenes de magnitud más grandes que la recuperación del aminoácido.

Un comportamiento muy peculiar se observa para los aminoácidos Glu y Gly: mientras que para otros aminoácidos los rendimientos de las PDs disminuyen uniformemente, estos valores para la PD de Gly y para el ácido piroglutámico pasan por un máximo cerca de 600°C. La desaparición

completa de los productos de condensación se observa para Val y Leu a 700°C; para Aib, Pro y Glu a 800°C, para Gly y Ala a 900°C. De esta manera, la relación entre la estabilidad térmica de las materias primas y la de sus productos de condensación no es la misma para los diferentes aminoácidos

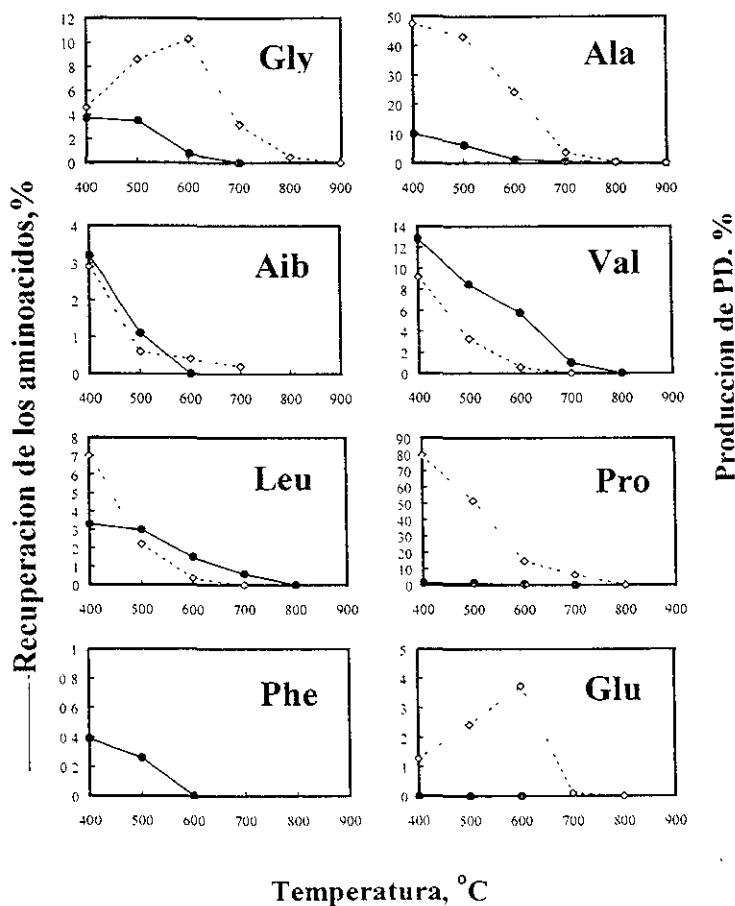


Fig. 15. La comparación de la recuperación de aminoácidos y la producción de PDs en función de la temperatura en atmósfera de N₂.

5.2.3. Influencia de la atmósfera en los resultados de la pirólisis

Varios investigadores mencionan que la atmósfera primitiva fue compuesta por el CO_2 y que probablemente contenía un porcentaje pequeño de CO y vapor de agua. Durante la formación de la atmósfera, éste pudo tener propiedades oxidativas, sin embargo más tarde pudo no tenerlas. Esto podría influir durante el calentamiento de las moléculas biológicas por lo que se tomó en cuenta durante los experimentos de pirólisis.

Sin embargo, los experimentos no muestran una diferencia notable en los productos de la pirólisis con las dos atmósferas estudiadas. Similares resultados se obtuvieron para Val en atmósfera de N_2 y CO_2 (Fig. 16; compare a Fig. 15). Al mismo tiempo, los valores de recuperación de Ala y la producción de su PD en atmósfera de CO_2 fueron más bajos en comparación con los de la atmósfera de N_2 (aproximadamente la mitad) y el aminoácido se descompone a 700°C (Fig. 10).

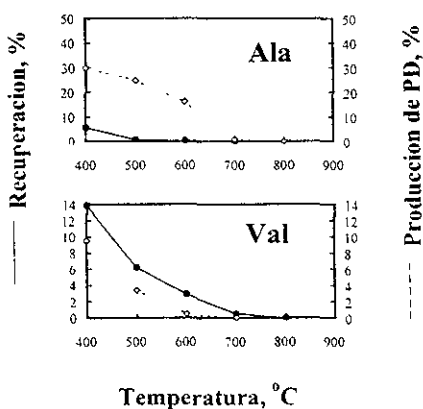


Fig. 16. Recuperación de Ala y Val y la producción de las correspondientes PDs a temperaturas por arriba de 400°C en los experimentos con atmósfera de CO_2

5.3. Pirólisis de las bases de ácidos nucleicos

Uracilo y adenina demostraron una estabilidad térmica más alta en términos de recuperación y las temperaturas de completa descomposición de estos compuestos se presentan en la Figura 11. Para adenina después de un calentamiento a 400°C la recuperación alcanzó un valor de 10% y 25% para 500 - 600°C , gradualmente disminuyó este parámetro al límite de temperatura de 1000°C (incluso a esa alta temperatura todavía encontró 0.2% de recuperación).

El valor máximo para el uracilo era casi igual que para la adenina a 500-600°C, sin embargo, la recuperación del uracilo no sólo disminuyó más rápidamente a 800°C, sino que también empezó con un valor muy bajo de 0.6% a 400°C durante un calentamiento de 30 min. Este hecho sugiere que 500-600°C es el intervalo de temperatura óptima para la supervivencia de éstas bases nitrogenadas, dentro del cual el proceso de sublimación rebasa al proceso de la pirólisis.

El mismo comportamiento se puede ver en el caso de la citosina, sin embargo, dentro del intervalo de temperatura estudiado, su recuperación no alcanzó ni siquiera 1%.

El comportamiento de guanina fue muy diferente: después de 20 minutos de exposición a 400°C, la muestra se carboniza y no se observa ninguna volatilidad o condensación del sublimado. A las temperaturas más altas se descompone, pero de nuevo no produce ningún sublimado. Así, guanina no se volatiliza bajo la presión atmosférica, por lo tanto su comportamiento térmico es diferente a otros compuestos biológicos estudiados en el presente trabajo.

Los experimentos reproducidos bajo la atmósfera de CO₂ en lugar de N₂ no demostraron las diferencias notables en la recuperación de bases de los ácidos nucleicos (Fig.17).

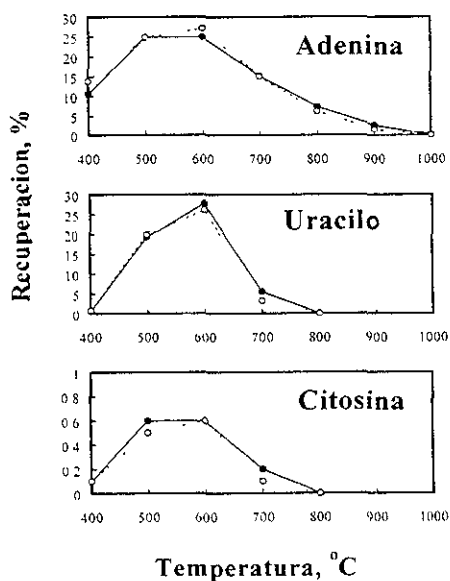


Fig. 17. Recuperación de bases de los ácidos nucleicos a temperaturas arriba de 400°C en experimentos con las atmósferas de N₂ (—) y CO₂ (---)

5.4. Recuperación de la valina, leucina y sus dicetopiperazinas en presencia de silicagel y la identificación de los productos obtenidos por CG/EITF/EM

5.4.1. Recuperación de la valina, leucina y sus PDs en presencia de silicagel

La recuperación de los aminoácidos valina y leucina en ausencia y en presencia de silicagel (SiO_2) se muestra en la figura 18, donde se puede observar que la presencia de silicagel no cambia significativamente la recuperación de los aminoácidos. Esto se debe a que el tiempo del contacto de los aminoácidos vaporizados con silicagel fue corto para cambiar el orden de transformación de los aminoácidos en las PDs comparado con los experimentos sin silicagel. Sin embargo, la recuperación de valina disminuyó de casi 13% en experimentos sin silicagel, a 9% con silicagel a la temperatura de 400°C. Lo mismo sucede a temperaturas más altas: a 500°C la cantidad de aminoácido recuperado disminuye de 9 a 7%; a 600°C de 6 a 5% y a 700°C de uno a 0.3%. En cambio, la producción de PDs aumenta de 9.2% en ausencia de silicagel, a casi 13% en la presencia de ésta a 400°C; de un poco más de 3% a más de 4% a temperatura de 500°C, y de menos de 0.5% a 1.5% a 600°C.

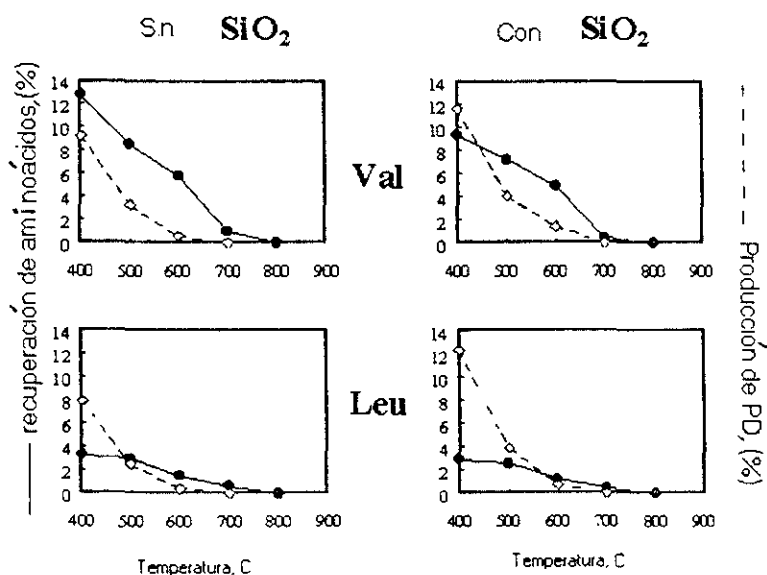


Fig. 18. Recuperación relativa de los aminoácidos valina y leucina en ausencia y en presencia de silicagel

La situación cambia un poco para la leucina, que casi no presenta cambios notorios para la recuperación de aminoácidos en presencia y ausencia de silicagel. Pero la producción de PDs aumenta de 8 a 12% a la temperatura de 400°C; de 2.8 a 4.3% a 500°C, de casi 0.4 a 1% a 600°C y a 700°C la recuperación no se detecta en ambos casos.

Es interesante citar, que la producción de PDs no se detecta a temperaturas más de 700°C en ambos casos y la recuperación de los aminoácidos se detecta a temperatura de 800°C.

5.4.2 La identificación de los productos de pirólisis de la valina en presencia de silicagel por CG/EITF/EM

El cromatograma de los productos de pirólisis de valina en presencia de gel de sílice, solubles en cloroformo, se muestra en la Fig.19. Los espectros de infrarrojo y masas correspondientes a estos compuestos se muestran en las figuras 7.4.1. (p.121-122) y 7.4.3. (p. 126-127) del Apéndice, donde los números de los espectros corresponden a los números de los picos en el cromatograma.

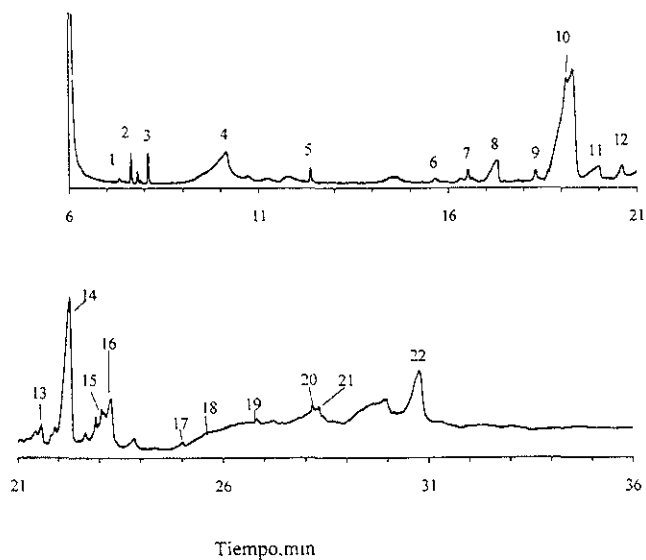


Fig. 19. Cromatograma de los productos de pirólisis de la valina en presencia de silicagel

Para el compuesto 1, que aparece después de 7 minutos en el cromatograma no se pudo obtener un espectro de masas de buena calidad (p.121), sin embargo, el espectro de infrarrojo de

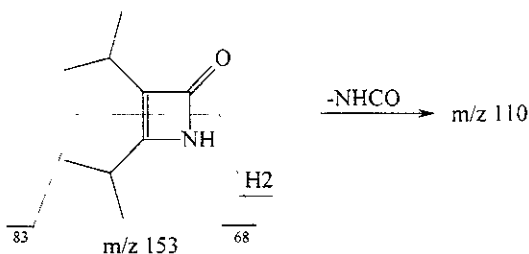
este compuesto (p 126) podría corresponder a un ácido carboxílico alifático según los datos de la biblioteca de EPA-REVA que presenta las bandas correspondientes a la absorción de ν_{OH} a 3575 cm^{-1} , δ_{CH} a 1395 cm^{-1} , $\nu_{C=O}$ de ácidos alifáticos saturados a 1777 cm^{-1} y δ_{CO} a 1280 cm^{-1} . En el Apéndice 7.3 (p.113) se presentan los resultados de la comparación del espectro de infrarrojo, obtenido experimentalmente, con el espectro de la biblioteca EPA-REVA.

El pico 2 en el cromatograma corresponde a la N,N-dietil-lauramida por su espectro de infrarrojo (p.126), que tiene la absorción $\nu_{C=O}$ de amidas terciarias a 1669 cm^{-1} y ν_{C-N} a 1465 y 1377 cm^{-1} . En el espectro de masas (p.121) no se puede distinguir el ion molecular a m/z 255, que corresponde al peso molecular de este compuesto, sin embargo, se encuentra el ion a m/z 113, que puede corresponder a la pérdida de un radical alquilo de la molécula, y otros iones a m/z 98 y 70 pueden ser debidos a la pérdida de los grupos CH_3 y CO , respectivamente.

El compuesto, que corresponde al pico 3 en el cromatograma, por su espectro de infrarrojo (p.126) se parece al compuesto 2 y tiene ν_{C-N} a 1465 cm^{-1} que corresponde a las amidas secundarias, pero la intensidad de absorción $\nu_{C=O}$ a 1674 cm^{-1} es más pequeña y de ν_{CH} más grande, que para el compuesto anterior. En su espectro de masas (p.121) tiene un pico a m/z 127, que puede corresponder a la N-etil-pentenamida. Sin embargo, no fue posible concordar los resultados obtenidos por espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas para proponer la fórmula de este compuesto.

El pico eluido aproximadamente a los 10 minutos (pico 4; Fig.13) se identifica fácilmente. Por su espectro de masas (p. 121) corresponde al ácido 3-metil-2-butenóico en la biblioteca Wiley 138K (la comparación del espectro de masas, obtenido experimentalmente, con el espectro de la biblioteca Wiley 138K se presenta en el Apéndice 7.3, p.117). Esta asignación también corresponde con su espectro de infrarrojo (p. 126), que tiene bandas de absorción de $\nu_{C=O}$ a 1750 cm^{-1} , de $\nu_{C=C}$ a 1657 cm^{-1} , ν_{OH} a 3579 cm^{-1} , dos picos de absorción de δ_{CH} a 1376 y 1450 cm^{-1} y la absorción de torcimiento τ_{CH} a 1112 cm^{-1} .

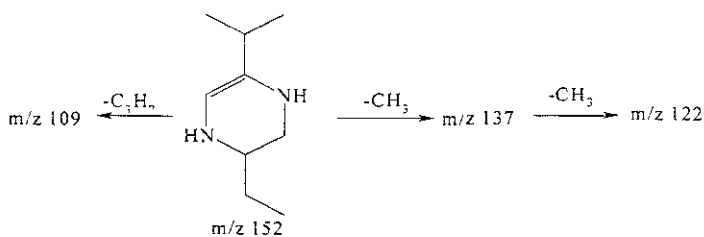
El producto 5 de la pirólisis exhibe las bandas de infrarrojo (p. 126) que pueden pertenecer a la 3,4-diisopropil- β -propiolactama y tiene la banda de absorción intensa de ν_{C-O} a 1749 cm^{-1} , la banda de ν_{NH} a 3037 cm^{-1} , ν_{CH} a 2973 cm^{-1} y ν_{C-N} a 1386 cm^{-1} . Su espectro de masas (p. 121) puede ser interpretado de la siguiente manera:



La comparación de los espectros de infrarrojo (p. 121) con la biblioteca de EPA-REVA para el compuesto 6 permite identificar a la valeramida (como en el caso de poli-valina, el compuesto 14). El espectro tiene una banda de absorción de $\nu_{\text{C=O}}$ de "amida I" y δ_{NH} "amida II" a 1727 y 1574 cm^{-1} , respectivamente, dos bandas de ν_{NH} a 3432 y 3544 cm^{-1} de las vibraciones simétrica y asimétrica, respectivamente y δ_{CO} a 1324 cm^{-1} . La comparación del espectro, obtenido experimentalmente, con el espectro de la biblioteca EPA-REVA se presenta en el Apéndice 7 3.(p. 114).

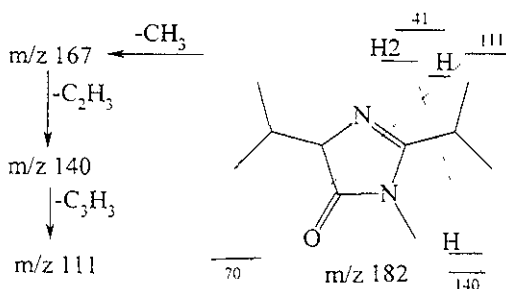
La naturaleza aromática del compuesto 7 (p. 126) puede ser sugerida por la forma de la banda ν_{CH} a 2972 cm^{-1} , δ_{CO} a 1218 cm^{-1} y la presencia de un sobretono a 1785 cm^{-1} característico de anillos sustituidos. Las bandas ν_{NH} a 3497 cm^{-1} y δ_{NH} a 1591 cm^{-1} apuntan a la presencia de un grupo amino en el compuesto. En el espectro de masas (p.121) se encuentra el pico a m/z 194, que puede corresponder al ion molecular que tiene un número par de átomos de nitrógeno o no tiene ninguno (no se confirmó con el espectro de infrarrojo). Solo se pudo suponer que este compuesto es parecido a 2,6-dietil-m-toluidina, pero se pudo identificar en definitiva este compuesto.

El compuesto que corresponde al pico 8 se identificó como 2-isopropil-5-etilpiperazina deshidrogenada. El espectro de infrarrojo (p. 126) de este compuesto tiene la absorción de ν_{NH} a 3498 cm^{-1} , δ_{NH} a 1564 cm^{-1} de "amida II", $\nu_{\text{C-N}}$ a 1302 cm^{-1} y $\nu_{\text{C=C}}$ aproximadamente a 1600 cm^{-1} . En su espectro de masas (p. 121) contiene un ion de m/z 152, que puede ser el ion molecular y otros fragmentos, que son debidos a las rupturas siguientes:

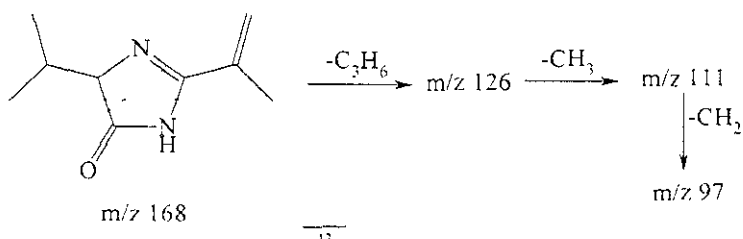


Los compuestos 9 (N-metil-2,5-diisopropil-imidazolona) y 11 (2-isopropenil-5-isopropil-imidazolona) contienen (p. 121) dos bandas de absorción de $\nu_{C=O}$ a 1745 y 1769 cm^{-1} , respectivamente, el espectro del compuesto 9 no contiene la absorción de ν_{NH} a 3476 cm^{-1} que aparece en el espectro del compuesto 11 (p. 122). Sin embargo, el compuesto 9 contiene la absorción de $\nu_{C=N}$ a 1468 cm^{-1} y una banda pequeña de ν_{NH} a 2363 cm^{-1} , característica de aminas terciarias (esta banda es más abundante en el espectro del compuesto 11). Para el compuesto 11 también aparecen las bandas de $\nu_{C=C}$ a 1640 y ν_{NH} a 1399 cm^{-1} de "amida I". Los espectros de masas (p. 126) permiten proponer las opciones siguientes para estos compuestos, Figura (a) para el 9 y (b) para el 11:

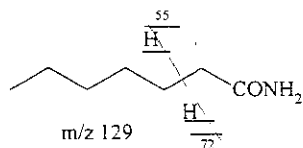
(a)



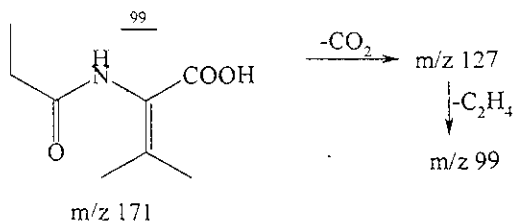
(b)



El compuesto 10, eluido después de 18 minutos, tiene en su espectro de infrarrojo (p. 121) las bandas características de amida primaria: ν_{NH} a 3416 cm^{-1} , ν_{NH} a 1390 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-H}}$ alifático a 2967 y 2885 cm^{-1} y $\nu_{\text{C=O}}$ a 1702 cm^{-1} . En el espectro de masas (p. 126) es difícil de encontrar el ion molecular, pero si suponemos que este es el pico a m/z 129, podemos explicar las rupturas de este compuesto (hexanamida) de la siguiente manera:

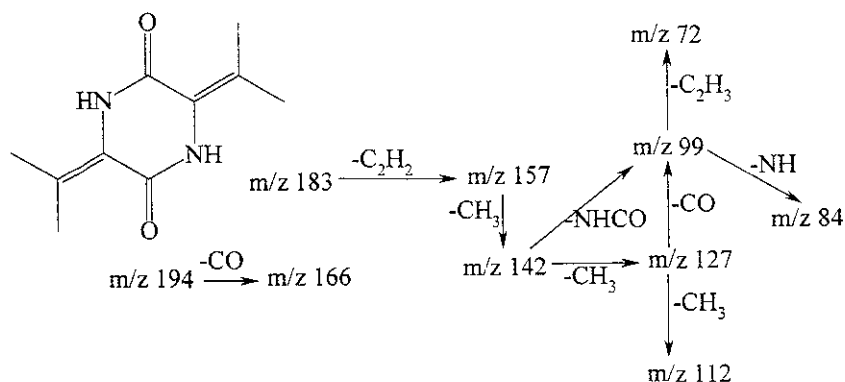


El siguiente pico 12, que aparece a aproximadamente 20 minutos, pertenece a un compuesto que tiene grupos amida y carboxilo, los cuales en el espectro de infrarrojo (p.122) corresponden con las bandas ν_{NH} a 3448 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-N}}$ a 1493 y 1337 cm^{-1} y $\nu_{\text{C=O}}$ a 1710 cm^{-1} y también presenta la banda de ν_{OH} a 3616 cm^{-1} . Su espectro de masas contiene (p.127) un ión a m/z 171, que podemos atribuir al ión molecular. Otras bandas de su espectro de masas pueden corresponder a las siguientes rupturas del dipéptido (Val-Val) desaminado didesmetilado y deshidrogenado:

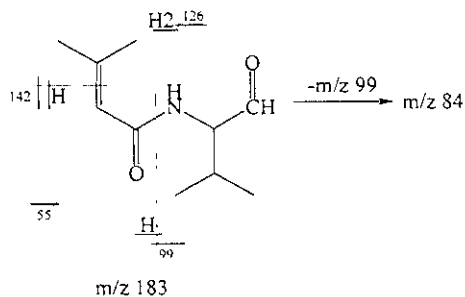


Uno de los productos de pirólisis más esperado y observado frecuentemente es PD (Munson and Vick, 1985; Ballistreri et al., 1985; Boon and Leeuw, 1987, Munson and Petterolf, 1987, Smith et al., 1988; Nogueroles et al., 1992; Voorhees et al., 1994; Hendrick and Voorhees, 1992). El compuesto 13 correspondería a este compuesto, que fue confirmado por comparación con el estándar. Su espectro de infrarrojo (p. 122) tiene la absorción característica de ν_{NH} a 3472 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-N}}$ de amina aromática a 1417 cm^{-1} , δ_{NH} a 664 cm^{-1} y la banda de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1752 cm^{-1} . En su espectro de masas (p.127) tiene un ion molecular a m/z 194, que puede corresponder a una dicetopiperazina sustituida y doblemente deshidrogenada. Su formación fue registrada anteriormente (Basiuk, 1998)

Los picos que se observan en el espectro de masas se explican según el siguiente patrón de fragmentación:

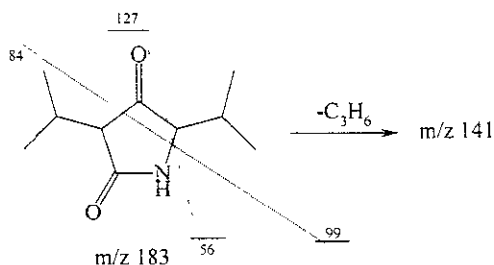


El pico 14 aparentemente es un dipéptido desaminado de valina, que sufrió la pérdida de un átomo de oxígeno de la parte C-terminal de la molécula. Tiene en su espectro de infrarrojo (p.122) las bandas de ν_{NH} a 3424 cm^{-1} , ν_{CH_3} de grupo isopropilo a 1375 cm^{-1} , $\nu_{C=C}$ a 1510 cm^{-1} , $\nu_{C=O}$ a 1703 y 1777 cm^{-1} y ν_{CH} a 2702 cm^{-1} características de un aldehído insaturado. En su espectro de masa (p. 127) tiene el ion molecular a m/z 183 y otros iones, que corresponden a las rupturas siguientes:



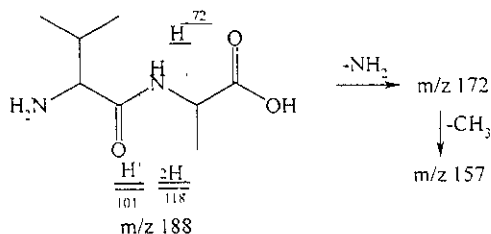
Para el compuesto 15 se observan las bandas (p. 122) de ν_{NH} a 3571 cm^{-1} típica para las amidas secundarias vaporizadas, dos bandas de ν_{C-N} a 1287 y 1410 cm^{-1} , dos bandas de $\nu_{C=O}$ a 1777 y 1719 cm^{-1} y δ_{C-O} a 1287 y 1209 cm^{-1} . Por el espectro de masas (p.127) este compuesto es parecido al de PD de valina (3,5-diisopropil-pirrolidina-2,4-diona) con un ion molecular a m/z 183, que se

refiere a la pérdida del grupo imino de la molécula de PD (m/z 198 - 15) y otros picos de este espectro, que se interpretan como las siguientes rupturas de su molécula:



Los dos compuestos de este tipo (sección 1.2.4.) fueron identificados mediante GC-MS entre los productos de la pirólisis de la poli-alanina por Boon and Leeuw (1987).

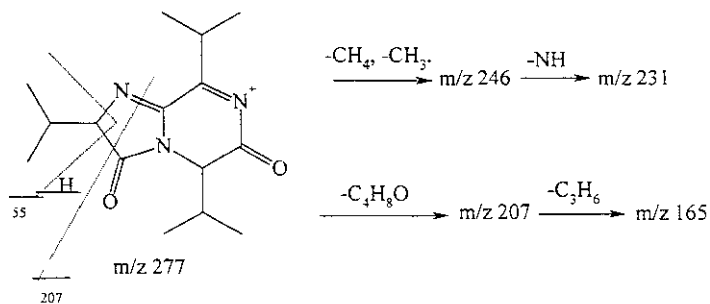
El espectro de infrarrojo (p. 122) del producto de la pirólisis 16 tiene dos bandas de ν_{NH} a 3500 y 3434 cm^{-1} y la banda de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1720 y 1777 cm^{-1} , además tiene la absorción de ν_{OH} a 3655 cm^{-1} y $\nu_{\text{C-N}}$ a 1503 y 1410 cm^{-1} . Por lo tanto, este compuesto puede ser el dipéptido de valina. El dipéptido tiene la masa molecular de 216, pero en el caso presente el ión más pesado en el espectro de masas (p. 127) es el de m/z 188. Esto puede significar que dos grupos metilo están ausentes. Otros picos del espectro de masas se pueden interpretar de la siguiente manera.



La presencia de los dipéptidos 12 y 14 y de los productos de su degradación implica que la formación de la dicetopiperazina pasa por la etapa de condensación de dos moléculas del aminoácido con la pérdida de una molécula de agua.

Para los dos siguientes picos, que corresponden a los compuestos 17 y 18, los espectros de infrarrojo (p. 122) son parecidos a las de amidinas bicyclicas de valina (imidazo[1,2-a]piperazin-3,6-dionas). El espectro del compuesto 17 contiene la absorción específica de ν_{NH} a 3500 cm^{-1} aproximadamente y la banda de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1704 cm^{-1} . El compuesto 18 tiene las bandas de absorción

de ν_{NH} a 3421 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-N}}$ a 1491 y 1395 cm^{-1} y las bandas de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1715 cm^{-1} y de $\delta_{\text{C=O}}$ a 1270 cm^{-1} , parecidos a los derivados de poli-valina y otras amidinas bicyclicas. Para el compuesto 17 no se obtuvo un espectro de masas de buena calidad, pero mediante la comparación de los espectros de infrarrojo (las bandas de ν_{CH_3} en el intervalo de 2700 a 3000 cm^{-1}) de este compuesto con el 18, podemos sugerir que la diferencia entre ellos consiste solamente en la cantidad de grupos metílicos. Los picos en el espectro de masas (p. 127) del compuesto 18 pueden ser debidos a las siguientes rupturas:



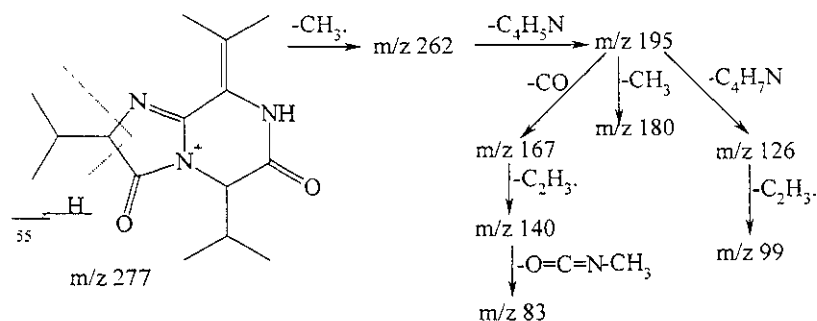
En el caso del compuesto 19 el espectro de infrarrojo (p. 122) no fue de buena calidad. Se puede distinguir solo los picos de la absorción de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1712 y 1680 cm^{-1} , de ν_{CH_3} a 2970 y 2881 cm^{-1} y de $\nu_{\text{C-N}}$ a 1418 cm^{-1} . De su espectro de masas (p. 127) se pudo concluir que este compuesto tiene un peso molecular mayor que la PD de valina y es parecido al de las amidinas bicyclicas (ion molecular a $\text{m/z } 307$), pero la fórmula mas o menos exacta no puede ser deducida para este caso.

Las amidinas bicyclicas (imidazo[1,2-a]piperazin-3,6-dionas) junto con los productos de su degradación fueron identificados en varios trabajos sobre la pirólisis de aminoácidos (Basiuk and Navarro-González, 1997; Basiuk et al., 1998a-c; Basiuk, 1998), utilizando las mismas técnicas acopladas.

El pico 20 corresponde a un compuesto carbonílico con varios grupos metilo, como se concluye de su espectro de infrarrojo (p. 122). Se observó la absorción de ν_{NH} a 3370 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=O}}$ a 1713 cm^{-1} , $\nu_{\text{C-N}}$ aproximadamente a 1490 y 1390 cm^{-1} y la absorción de $\nu_{\text{C-C}}$ a 1631 cm^{-1} . Su espectro de masas (p. 127) tiene un ion a $\text{m/z } 281$, que puede corresponder al ion molecular, y un ion abundante a $\text{m/z } 156$ que se encontraba en los espectros de los compuestos 18 y 19, sin embargo, de la misma forma que para el compuesto 19 no es posible proponer la fórmula precisa.

Para el pico 21 el espectro de infrarrojo también fue de baja calidad (Apéndice 7.4, p. 122) y solamente se observaron las bandas de $\nu_{C=O}$ a 1718 y de $\delta_{C=O}$ a 1285 cm^{-1} , lo que no permitió proponer la fórmula para este compuesto. El ión molecular a m/z 324 en su espectro de masas (p. 127) permite suponer que este compuesto puede ser una amidina tricíclica de la valina (hexahidroimidazo-[1,2-a]imidazo[1,2-d]piperazin-3,8-diona), pero no hay datos adicionales que permitan confirmarlo.

El compuesto 22 que corresponde al último pico en el cromatograma, es parecido a una amidina bicíclica por su espectro de infrarrojo (p. 122). Tiene la absorción característica para este tipo de compuestos: las bandas de $\nu_{C=O}$ a 1712 cm^{-1} y de $\delta_{C=O}$ a 1285 cm^{-1} , ν_{NH} a 3428 y 1391 cm^{-1} , como los compuestos 17 y 18. El ión a m/z 277 podría ser un fragmento del ión molecular (p. 127) de este compuesto, y el ion de m/z 281 de muy baja intensidad que puede ser el ion molecular, lo cual podría explicar la presencia de los otros iones abundantes en el espectro de masas de la siguiente manera



Así, que entre los productos menos volátiles de la pirólisis de valina a temperatura de 500°C en la presencia de silicagel se pueden proponer las estructuras de: dos ácidos carboxílicos, uno de los cuales es el ácido 3-metil-2-butenóico, varias amidas (N,N-dietil-lauramida, N-etil-pentenamida y valeramida y hexamida), 3,4-diisopropil- β -propiolactamo, 2,6-dietiltoluidina, 2-isopropil-5-etil-piperazina, dos imidazolonas (N-metil-2,5-diisopropil- y 2-isopropenil-5-isopropil-imidazolona), una dicetopiperazina doblemente deshidrogenada, tres dipéptidos de valina (dipéptido desaminado y didesmetilado, desaminado y deshidrogenado y didesmetilado), 3,5-diisopropil-pirrolidin-2,4-diona, las BCA de valina y sus isómeros y TCA.

5.4.3 La identificación de los productos de pirólisis de la leucina en presencia de silicagel por CG/EI/EM

Los productos de la pirólisis de la leucina en presencia de silicagel corresponden a los picos del cromatograma de la Figura 20. Los espectros de infrarrojo y masas correspondientes a estos compuestos se muestran en figuras 7.4.2. (p. 123-125) y 7.4.4 (p. 128-130) del Apéndice 7.4, donde los números de los espectros corresponden a los números de los picos en el cromatograma.

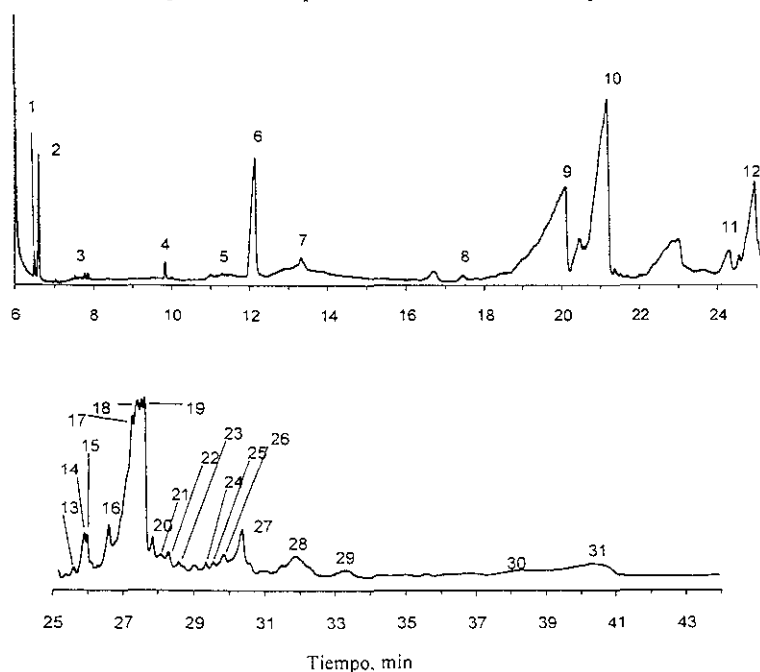


Fig. 20. El cromatograma de los productos de pirólisis de la leucina

El pico 1 corresponde a una amina primaria por su espectro de infrarrojo (p. 123) que es similar a la 3-metilbutilamina. En este espectro se presentan las absorciones de ν_{NH} aproximadamente a 3500 cm^{-1} y de δ_{NH} de aminas primarias a 1623 cm^{-1} . $\nu_{\text{C-N}}$ a 1468 y 1320 cm^{-1} . El espectro de masas (p. 128) concuerda con esta conclusión. Un ion abundante a m/z 87 es el ion molecular, el ion a m/z 58 y 44 corresponden a los fragmentos característicos de aminas primarias (C_2H_5 -

CH=NH₂⁺) y (CH₃-CH=NH₂⁺), respectivamente y el ion a m/z 70 se produce por la pérdida del grupo NH₂.

El compuesto 2 se identifico como un alcano ramificado por su espectro de infrarrojo (p. 123). El espectro presenta las bandas de ν_{CH} alifático a 2966 y 2890 cm⁻¹, de δ_{CH_2} a 1463 cm⁻¹, δ_{CH_3} a 1383 cm⁻¹ y oscilación de CH₂ de hidrocarburos para la cadena de 7 y más átomos de carbono ρ_{CH_2} a 738 cm⁻¹. En los espectros de masas de los hidrocarburos ramificados frecuentemente no se puede encontrar el ion molecular. Sin embargo, ion a m/z 118 (p. 128), corresponde a un fragmento de la molécula con más de 8 átomos de carbono y el ion a m/z 90 a la pérdida de CH₄. Los iones a m/z 70, 55 y 43 pueden corresponder a los fragmentos C₃H₁₀, C₄H₇ y C₃H₇, respectivamente.

El producto 3 de la pirólisis corresponde a una cetona insaturada y no muy ramificada: su espectro de infrarrojo (p. 123) contiene la absorción intensa de $\nu_{C=C}$ a 1672 cm⁻¹ y $\nu_{C=O}$ de intensidad baja a 1774 cm⁻¹, δ_{CH_2} a 1457 cm⁻¹, δ_{CH_3} a 1379 cm⁻¹, así como una absorción ν_{CH} a 2962 cm⁻¹. Su espectro de masas (p. 128) tiene un ion de m/z 112, que puede ser el ion molecular, entonces la fórmula del compuesto corresponde a C₇H₁₂O. Otros iones, que aparecen a m/z 98, 70 y 56 pueden ser debidos a la pérdida consecutiva de los grupos CH₂, CO y CH₂, respectivamente.

El compuesto 4 por su espectro de infrarrojo (p. 123) es un alqueno ramificado. Esto se confirma por la intensa absorción de $\nu_{C=C}$ a 1672 cm⁻¹ (característica para olefinas di-, tri- o tetraquilosustituídos) y las bandas de ν_{CH_3} a 2966, 2882 y 1465 cm⁻¹, δ_{CH_3} a 1372 cm⁻¹, así y ν_{CH_2} a 2843 cm⁻¹. Sin embargo, en este alqueno doble enlace no está entre los carbonos terminales, por lo tanto no se presenta la banda a 3010-3095 cm⁻¹. En su espectro de masas (p. 128) contiene un ion a m/z 140, que puede ser el ion molecular. Entonces se puede atribuir la fórmula del compuesto C₁₀H₂₀. Los iones a m/z 124 y 98 son debidos a la pérdida de los fragmentos CH₄ y C₃H₆, respectivamente, del ion molecular. Otros iones a m/z 84, 70 y 55 corresponden a los fragmentos C₆H₁₂, C₅H₁₀ y C₄H₇, respectivamente.

El producto de la pirólisis 5 por su espectro de infrarrojo (p. 123) se parece a la isovaleramida. Este espectro contiene dos bandas de absorción de ν_{NH} en el intervalo de las frecuencias de 3400-3600 cm⁻¹, δ_{NH} a 1589 cm⁻¹, δ_{C-H} a 1370 y 1459 cm⁻¹ (corresponden a vibraciones de flexión simétrica y asimétrica, respectivamente), así como la absorción de "amida I" $\nu_{C=O}$ a 1731 cm⁻¹. Además su pico en el cromatograma de gases se encuentra a un tiempo de 11.3 minutos que

corresponde a la isovaleramida, identificada anteriormente bajo las mismas condiciones de análisis (Basiuk, 1998).

Según la biblioteca Wiley 138K, el espectro de masas del compuesto 6 corresponde a N,N-dietililamina. Su espectro de infrarrojo (p. 123) contiene la absorción de $\nu_{C=C}$ a 1670 cm^{-1} , ν_{C-N} a 1377 cm^{-1} (característica de aminas terciarias) y varias bandas de ν_{CH} en el intervalo de 2884 y 3000 cm^{-1} . Las aminas terciarias no absorben a longitudes de onda alrededor de 3500 y no se encontró otras evidencias de la presencia de un nitrógeno terciario, lo que no permitió una identificación más segura.

El pico 7, que aparece después de 13 minutos, se identifica fácilmente por su espectro de masas, que corresponde a 5-metil-2-isopropil-2-hexenal en la biblioteca de Wiley 138K. En su espectro de infrarrojo (p. 123) tiene una absorción específica de un aldehído a ν_{CH} a 2703 cm^{-1} y la banda de $\nu_{C=O}$ a 1707 cm^{-1} , así como $\nu_{C=C}$ a 1631 cm^{-1} y las bandas de ν_{CH} a 2967 , 2886 y 2823 cm^{-1} .

El producto de pirólisis 8 por su espectro de infrarrojo (p. 123) se parece a un polimetilalcano: tiene las bandas de ν_{CH} a $2966 - 2884\text{ cm}^{-1}$ y δ_{CH_3} a 1371 cm^{-1} . Su espectro de masas (p. 128) contiene un ion de m/z 196: es poco probable que éste sea el ion molecular, sin embargo, podría corresponder a un fragmento de $C_{14}H_{26}$ o (C_nH_{2n-2}) que es característico para los alcanos

El producto de pirólisis 9 exhibe en su espectro de infrarrojo (p. 123) la absorción de ν_{N-H} a 3498 cm^{-1} , ν_{C-N} a 1321 cm^{-1} y las de ν_{CH} en el intervalo de 2850 a 3000 cm^{-1} . En su espectro de masas (p. 128) encontramos un ion a m/z 181, que puede ser el ion molecular de una amina secundaria $C_{12}H_{25}N$ y los iones abundantes a m/z 166, 151 y 124 corresponden a las pérdidas de los fragmentos CH_3 , C_2H_3 y C_4H_9 , respectivamente

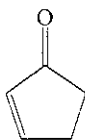
El compuesto 10 se identificó tentativamente como un alcano ramificado por su espectro de infrarrojo (p. 123), en el cual se encuentra la absorción intensa de los grupos metilo a 2964 cm^{-1} y δ_{CH_2} a 1464 cm^{-1} . Pero es difícil de encontrar el ion molecular (p. 128), de la misma forma que para muchos hidrocarburos. Solo se puede decir, que este compuesto tiene más de 16 átomos de carbono (ion a m/z 219).

Los espectros de infrarrojo (p. 124) de los compuestos 11 y 13 son parecidos a los de cetonas ramificadas (la absorción de $\nu_{C=O}$ de las cetonas alifáticas a 1721 y 1723 cm^{-1} , respectivamente). El

compuesto 11 además tiene el pico de baja intensidad de $\nu_{C=C}$ a 1648 cm^{-1} , que corresponde a un compuesto insaturado *cis* disustituido. Considerando los iones del espectro de masas (p. 128) de m/z 250 y 307 como los iones moleculares, se puede asignar las formulas generales $C_{17}H_{30}O$ para el compuesto 11 y $C_{20}H_{38}O$ para el compuesto 13. El ion más abundante de m/z 237 encontrado en el espectro de masas del compuesto 11 podría ser debido al fragmento $C_{16}H_{28}O$ (o $C_nH_{2n-2}O$) y otro ion a m/z 43 que corresponde al fragmento $CH_3-C^+=O$. ámbos fragmentos son característicos de las cetonas alifáticas. Y para el compuesto 13 el ion más abundante de m/z 221 se debe a la pérdida del fragmento de $C_5H_{10}O$ del ion molecular.

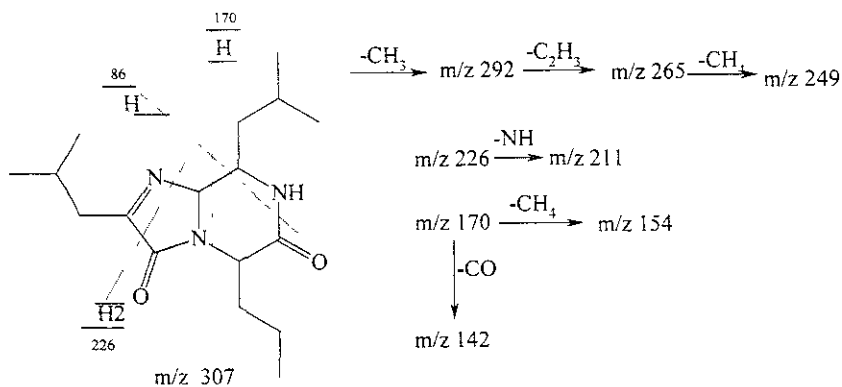
Según los espectros de infrarrojo (p. 124), los compuestos 12 y 14 se parecen a los alcanos ramificados, pero tienen pequeñas bandas de absorción de $\nu_{C=O}$ a 1726 y 1724 cm^{-1} , respectivamente, que pueden ser debidos a la contaminación por los compuestos 11 y 13. Como normalmente no se puede encontrar el ion molecular para muchos hidrocarburos grandes, en el caso del compuesto 12 (p. 128) solo se puede suponer que este compuesto es más grande, que $C_{18}H_{38}$ (el ion de m/z 253). De la misma manera, para el compuesto 14 (p. 129) se pudo constatar que el ion de m/z 292 corresponde al fragmento $C_{21}H_{40}$.

El compuesto 15 en su espectro de infrarrojo (p. 124) tiene una banda muy intensa de $\nu_{C=O}$ a 1743 cm^{-1} , $\nu_{C=C}$ a 1629 cm^{-1} y δ_{CH_2} a 1466 y 1388 cm^{-1} . Los datos de la biblioteca EPA-REVA proponen la estructura de una cetona insaturada cíclica con estructura ramificada más compleja que la siguiente:



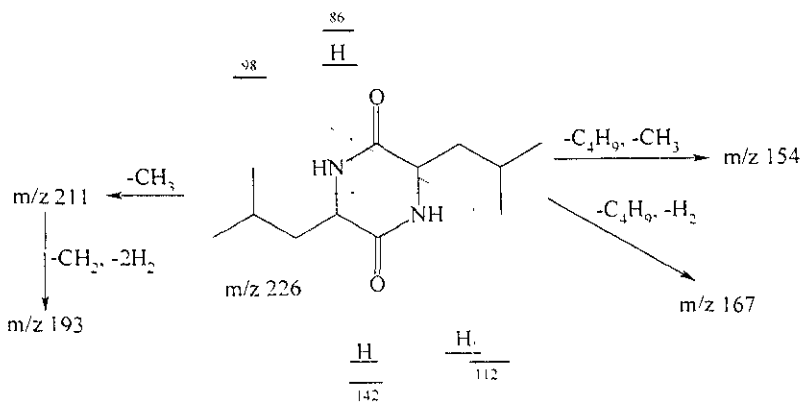
Sin embargo, en este caso el compuesto tiene un peso molecular (p. 129) de por lo menos 266 que es mucho más alto que del compuesto propuesto. A partir de los datos espectrales es difícil de proponer una fórmula definitiva para este compuesto.

El compuesto 16 por su espectro de infrarrojo (p. 124) puede ser una amidina bicíclica. Tiene las bandas de ν_{C-O} a 1797 y 1739 cm^{-1} , ν_{C-N} a 1707 cm^{-1} y ν_{C-N} a 1372 cm^{-1} , dos bandas de ν_{N-H} a 3483 y 3422 cm^{-1} y una a 1415 cm^{-1} . En su espectro de masas (p. 129) tiene el ion molecular a m/z 265 y otros picos, que se originan de la siguiente fragmentación



Sin embargo, no se pudo explicar la presencia de dos bandas de ν_{NH} en lugar de una, como se observaba antes (Basiuk et al., 1998a).

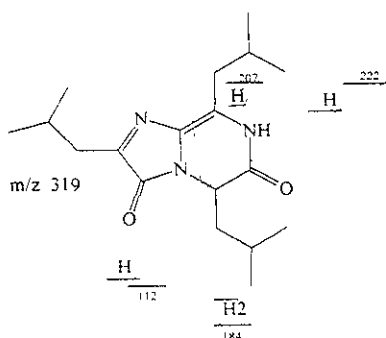
Los compuestos, que corresponden a los picos 17, 18 y 19 son las PDs de leucina y sus productos de descomposición térmica. Para el análisis de estos compuestos utilizamos un estándar externo de la PD de leucina. Sus espectros de infrarrojo (p. 124) corresponden a los espectros del estándar y en todos hay una banda de absorción de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1722 cm^{-1} y las bandas de ν_{NH} a 3423 cm^{-1} de baja intensidad, de ν_{CH} en intervalo de 2850 a 3000 cm^{-1} , de δ_{CH} a 1410 cm^{-1} y δ_{CO} a 1268 cm^{-1} . E y En su espectro de masas (p. 129) el ion molecular a m/z 226 tiene muy poca abundancia, aparentemente debido a una intensa fragmentación con la pérdida de un grupo CH_3 (el ion más abundante a m/z 211). Otros picos en el espectro corresponden al siguiente patrón de fragmentación.



La presencia de tres picos (17-19) con las mismas características espectrales se puede explicar por la descomposición *in situ* de la PD y la formación de diastereoisómeros (el mismo fenómeno se observa al inyectar el compuesto auténtico).

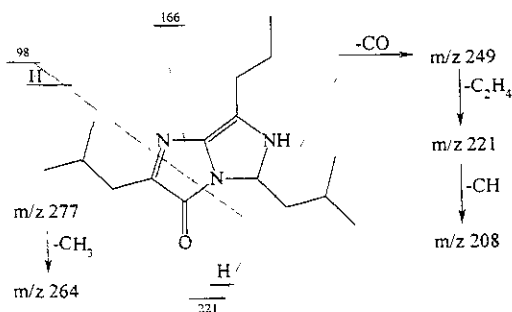
Por sus tiempos de retención y características espectrales, los siguientes compuestos aparentemente están relacionados a las amidinas bicyclicas deshidrogenadas. Los compuestos 20, 24, 25 y 26 son parecidos entre si por sus espectros de infrarrojo (p. 124-125). Tienen dos bandas de absorción de $\nu_{C=O}$ a 1724 y 1694 cm^{-1} , ν_{NH} a 3425 cm^{-1} de poca abundancia, de δ_{CH} a 1385-1388 cm^{-1} y δ_{NH} a 1550 cm^{-1} . Sus espectros de infrarrojo también son parecidos a los espectros de los compuestos 16 y 21. Además, en sus espectros de masas (p. 129-130) se encuentran como iones más abundantes a m/z 319, 320, 318 y 318, respectivamente. Esto puede significar, que los compuestos 24 y 25 con 20 y 26 son dos pares de isómeros de las amidinas bicyclicas que difieren entre ellos por dos átomos de hidrógeno.

El compuesto 21 por su espectro de infrarrojo (p. 125) se parece a una amidina bicyclica deshidrogenada y presenta las bandas de absorción de $\nu_{C=O}$ a 1724 cm^{-1} , ν_{CH_2} a 2966 cm^{-1} , δ_{CH} a 1468 cm^{-1} , δ_{CH} a 1387 cm^{-1} y la banda de ν_{NH} a 3425 cm^{-1} . Este compuesto también fue identificado anteriormente y su espectro de infrarrojo fue confirmado por la simulación (Basiuk et al., 1998a). Su espectro de masas (p. 129) tiene un ion a m/z 319, que corresponde al ion molecular. El ion más abundante es de m/z 166 correspondiendo a la pérdida de (CH_4+H_2) del ion de m/z 184 y el ion a m/z 261 corresponde a la pérdida del grupo C_4H_{10} del ion molecular. Otros iones en su espectro corresponden a las siguientes rupturas:

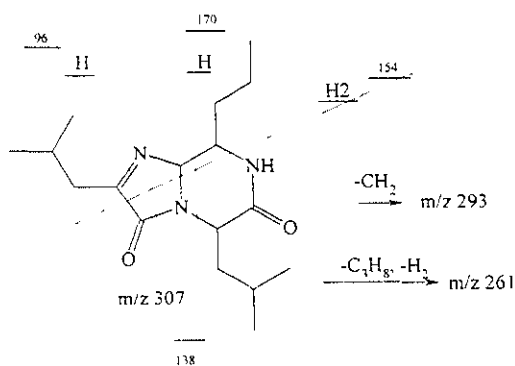


El pico 22 corresponde a un compuesto que se formó de la descomposición de la amidina bicyclica *in situ*. El juego de tres bandas (p. 125) de los enlaces dobles (dos de $\nu_{C=O}$ y una de $\nu_{C=C}$)

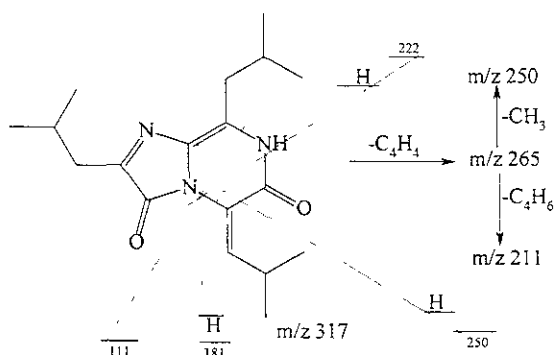
alrededor de 1700 cm^{-1} es parecido al compuesto 21. En su espectro de infrarrojo los picos están a las mismas frecuencias, sin embargo, la intensidad de la absorción de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1724 cm^{-1} es menor. El argumento a favor de la presencia de la amidina es el ion molecular (p. 129) de m/z 320 en el espectro de masas. Esto permitió atribuir la fórmula del compuesto con el peso molecular 277 que produce las siguientes rupturas:



El compuesto también 23 es parecido al 21 por su espectro de infrarrojo (p. 125) y tiene las bandas características casi a las mismas frecuencias (la absorción de $\nu_{\text{N-H}}$ a 3424 cm^{-1} y de $\nu_{\text{C=O}}$ a 1719 cm^{-1}). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de contaminación por los compuestos vecinos. Para los espectros de infrarrojo de los compuestos 23 y 27 que también se identificaron anteriormente, fueron hechos las simulaciones de los espectros de infrarrojo (Basiuk et al., 1998a). En el espectro de masas del compuesto 23 (p. 129) se encuentra un ion de m/z 307, que puede ser el ion molecular. Admitiendo, que este compuesto se origina de la pérdida de CH_2 de la amidina bicíclica, los picos en su espectro de masas pueden corresponder al siguiente patrón de fragmentación



El compuesto, que corresponde al pico 27, por su espectro de infrarrojo (p. 125) es el producto de la doble deshidrogenación de la amidina bicíclica de leucina, que fue identificada anteriormente y para su espectro de infrarrojo se hicieron simulaciones por el programa "HyperChem" (Basiuk, 1998). La pérdida del hidrógeno puede suceder teóricamente en varios sitios de la amidina. El espectro de masas (p. 130) contiene un ion de m/z 317, que se considera como el ion molecular (otros iones más grandes, pueden ser contaminantes de los picos posteriores, inclusive el ion de m/z 321 que pertenece a la amidina bicíclica). Las rupturas de este compuesto bajo impacto electrónico producen los siguientes picos en el espectro de masas



Los últimos compuestos 28-31 son los más difíciles de identificar. Estos compuestos también se parecen a las amidinas bicíclicas de leucina por sus espectros de infrarrojo (p. 125). Sin embargo, no presentan una segunda banda de la absorción intensa en intervalo de $1600-1800\text{ cm}^{-1}$, característica para las amidinas tricíclicas. Estas bandas aparecen en los espectros de infrarrojo de estos compuestos, simulados por "HyperChem" en el trabajo de Basiuk y Navarro-González (1997). El problema fundamental aquí es la presencia sistemática en sus espectros de masas (p. 130) de los picos que corresponden a compuestos más pesados que las PD y las amidinas bicíclicas, y pueden corresponder a las amidinas tricíclicas. La presencia de los iones pesados podría ser interpretada también por las reacciones secundarias de las amidinas bicíclicas formadas, en las cuales algunas moléculas o radicales se adicionan a las amidinas. Sin embargo, carecemos de datos espectrales para confirmar esta hipótesis y determinar las estructuras correspondientes.

Para los productos menos volátiles de la pirólisis de leucina a la temperatura de 500°C en presencia de silicagel se pueden proponer las fórmulas de 3-metilbutilamina y una amina secundaria $C_{12}H_{23}N$, cinco hidrocarburos saturados ramificados y uno insaturado, tres cetonas

unificadas alifáticas y una cíclica, isovaleramida, N,N-dietilalilamina, 5-etil-2-isopropil-2-hexenal, una amidina bicíclica y sus productos de deshidratación, deshidrogenación y pérdida de los sustituyentes alifáticos.

Comparando los productos obtenidos en este trabajo y los que se identificaron en el trabajo de Basiuk (1998) para la valina y leucina en ausencia de silicagel a las mismas condiciones experimentales y analíticas se puede concluir que la cantidad de los productos identificados relativamente seguro es más grande para ambos compuestos (así, para la valina, la diferencia es en la cantidad de 10 compuestos y para la leucina - 14). Varios productos identificados son los mismos en ambos casos y para ambos compuestos. Sin embargo, se nota la mayor cantidad y variedad de los compuestos con un peso mayor (como las PDs, las amidinas bicíclicas y con la posibilidad de las amidinas tricíclicas) en presencia de silicagel. No se encontró evidencia de hidantoinas para la valina ni para la leucina, aunque la hidantoína de leucina se identificó en el caso de la pirólisis sin silicagel (Basiuk, 1998).

Las diferencias también se notan en el análisis cuantitativo por HPLC de estos compuestos en presencia y ausencia de silicagel, lo cual demuestra el aumento notorio de la producción de las PD y al mismo tiempo, la disminución de los aminoácidos recuperados a temperaturas de 400 a 600°C estudiadas.

5.5. Pirólisis de poli-aminoácidos

5.5.1. Productos de pirólisis de la poli-glicina

La formación del humo durante la pirólisis se observaba después de aproximadamente 1 minuto y terminaba completamente después de 2-3 min; los productos de descomposición de bajo peso molecular, que fueron los más volátiles, se eliminaron con el flujo de nitrógeno. La condensación de la mezcla de los compuestos menos volátiles se observaba simultáneamente en las paredes del reactor fuera del horno. La pirólisis de la poli-glicina a 500°C bajo una atmósfera de nitrógeno da lugar a los productos de descomposición volátiles con peso molecular bajo, así como a los compuestos menos volátiles que fueron analizados por la técnica acoplada de CG/EITF/EM.

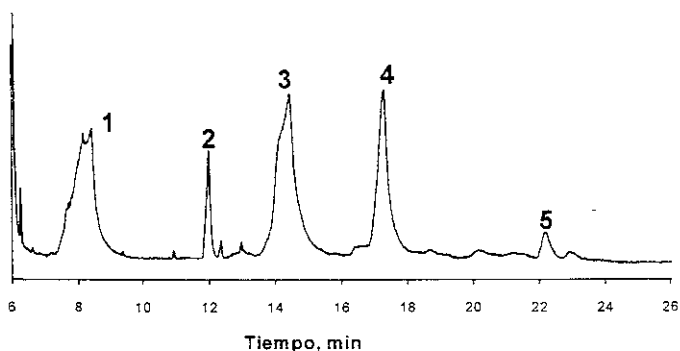
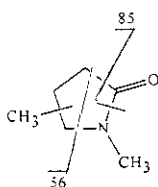


Fig. 21. El cromatograma de los productos de pirólisis de poli-Gly

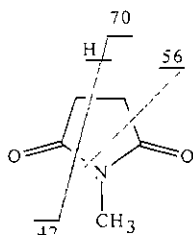
En la figura 21 se puede distinguir fácilmente varios productos que se forman en mayor concentración. Los espectros de infrarrojo y masas correspondientes a estos compuestos se muestran en el Apéndice 7.5.1 (p. 131), donde los números de los espectros corresponden a los números de los picos en el cromatograma.

El primer pico, eluido después de 8 minutos comprende varios compuestos, pero el espectro que corresponde a su máximo se obtiene con una calidad bastante buena. La comparación de los espectros obtenidos con los espectros de masas (p. 118) e infrarrojo (p. 115) de las bibliotecas electrónicas Wiley 138 y EPA-REVA (los resultados de la comparación se presentan en el Apéndice 7.3.3) permite identificar a la acetamida. El pico más abundante con m/z 44 es debido a la ruptura del enlace C-C y pérdida del grupo CH_3 .

El siguiente pico emitido a 12 minutos aproximadamente (pico 2) pertenece a una α,γ -dimetil-2-pirrolidinona, según la posición de la banda de $\nu_{\text{C=O}}$ en su espectro infrarrojo (p. 131). La comparación del espectro, obtenido experimentalmente, con el espectro de la biblioteca EPA-REVA se presenta en el Apéndice 7.3.4. (p. 116). El espectro de masas (p. 131) tiene un pico intenso a m/z 113 que puede ser el ión molecular. Observando el espectro de infrarrojo que no contiene absorción de ν_{NH} notable en la región de $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, suponemos que uno de los grupos metilo está en lugar del átomo H del grupo NH, pero la posición del segundo grupo CH_3 no puede determinarse exactamente: podría ser la posición C(3), C(4) o C(5). Sin tomar en cuenta la posición, los picos de m/z 56 y 85 pueden ser explicadas por la siguiente fragmentación

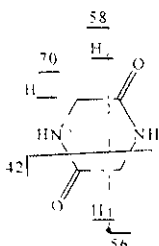


El compuesto eluido después de 14 minutos (pico 3) presenta un hombro debido a otro producto co-eluido de descomposición térmica de poli-Gly y también corresponde a una masa molecular de 113. Su espectro de infrarrojo (p. 131) es muy parecido a los espectros de N-alkil-succinimidas (los espectros disponibles en el banco de datos muestran un detalle interesante para todos ellos: la presencia de la banda a aproximadamente 3450 cm^{-1} , a pesar de la N-sustitución). Por otro lado la banda $\nu_{\text{C=O}}$ se encuentra a 1771 cm^{-1} . Se consideró que el compuesto analizado es el homólogo más simple, la N-metil-succinimida, que produce bajo la fragmentación del impacto electrónico los picos de números de masa siguientes:

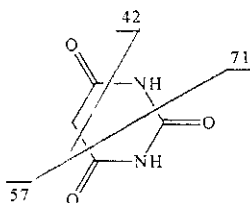


Los picos de m/z 85 y de m/z 99 son debidos a la pérdida de los fragmentos CO y CH_2 , respectivamente

El pico 4 que aparece después de 17 minutos se identificó fácilmente (p. 131) como la PD de Gly (confirmado por la inyección del compuesto estándar). El espectro infrarrojo tiene los picos característicos a 3491 cm^{-1} de ν_{NH} y a 1756 cm^{-1} de $\nu_{\text{C=O}}$. El espectro de masa contiene el ión molecular de m/z 114 y presenta la siguiente fragmentación:



Quizás el producto más interesante e inesperado de la pirólisis de poli-Gly es el pico 5. Este compuesto tiene un espectro de infrarrojo (p. 131) con una banda doble de $\nu_{C=O}$ a 1710 y 1738 cm^{-1} y la absorción de ν_{NH} a 3442 cm^{-1} . Los datos de la EPA-REVA muestran trazos espectrales parecidos, que corresponden a los barbituratos C-sustituídos. El espectro de masa no exhibe bandas notables con m/z más altos que 128, permitiendo pensar que esta banda corresponde al ion molecular. Está presente también una banda debida a la pérdida del grupo CO a m/z 100. El único barbiturato de semejante masa molecular es el ácido barbitúrico y su fragmentación se explica de la siguiente manera



Así, todos los productos identificados de la pirólisis de la poli-glicina son los compuestos N-heterocíclicos: acetamida, dimetil 2-pirrolidiona, N-metil-succinimida, derivados de piperazin-2,5-diona de glicina y ácido barbiturico.

5.5.2. Productos de pirólisis de la poli-alanina

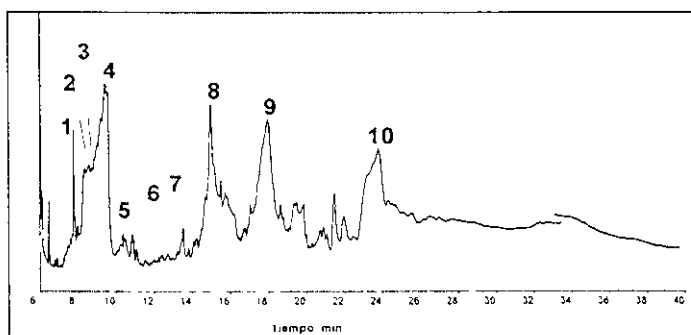


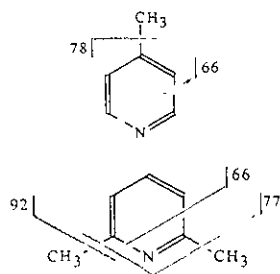
Fig. 22. El cromatograma de los productos de pirólisis de la poli-alanina

Es natural que los aminoácidos con sustituyentes alquílicos más grandes producen una mayor cantidad de los productos posibles de la pirólisis, y esto se observa en el presente caso, cuando se comparan los resultados de la pirólisis de poli-Ala con los de poli-Gly. El cromatograma (Fig 22) tiene numerosos picos con una resolución baja que complica la tarea para la obtención de los espectros de masas e infrarrojo para los diferentes compuestos.

Por esa razón únicamente se identificaron diez compuestos. Los espectros de infrarrojo y masas correspondientes a estos compuestos se muestran en Fig. 7.5.2 del Apéndice 7.5 (p. 132-133), donde los números de los espectros corresponden a los números de los picos en el cromatograma.

El primer compuesto no muestra la absorción del grupo carbonilo en su espectro de infrarrojo (p. 132). La biblioteca Wiley 138K propone 2 opciones: 1-metil-pirrol y 2-metil-pirrol. Sin embargo, la semejanza mayor es con el espectro del primer compuesto.

Para los siguientes dos productos (picos 2 y 3) no se obtuvieron buenos espectros de infrarrojo (p. 132), ya que se trata posiblemente de una contaminación abundante con el compuesto que corresponde al pico 4. Después de obtener el resultado de la búsqueda de alta calidad en la biblioteca Wiley 138K (la comparación de los espectros de masas, obtenidos experimentalmente, con los espectros de la biblioteca Wiley 138K para ambos compuestos se presenta en el Apéndice 7.3 (p 119-120), se decidió que los compuestos son 4-metil-piridina (2) y 2,6-dimetil-piridina (3). Las bandas en sus espectros de masas son debidas a las siguientes fragmentaciones:



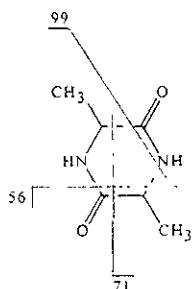
El compuesto que corresponde al pico 4 exhibe los rasgos típicos de los espectros de infrarrojo (p. 132) para amidas primarias un pico ν_{C-O} a 1744 cm^{-1} (característico para las amidas), un pico ν_{NH} (de amida secundaria) a 1599 cm^{-1} , y dos picos ν_{NH} (vibraciones simétricas y asimétricas) cerca de 3500 cm^{-1} . El espectro de masas es muy parecido al espectro de propionamida que corresponde al ión molecular a m/z 73.

Un producto menor que aparece como el pico 5 no es un compuesto carbonílico, según su espectro de infrarrojo (p. 132) que no tiene bandas intensas en la región de 1600-1800 cm^{-1} . Muestra similitud al espectro de 1-metil-pirrol (compuesto 1) en la región de las frecuencias bajas, pero tiene intensidad mucho más alta de absorción de ν_{CH} , al igual del pico de ν_{NH} a 3492 cm^{-1} . El espectro de masas del 2-etil-4-metil-pirrol de la biblioteca Wiley 138K es similar al obtenido. La presencia de los grupos metilo y etilo y del grupo NH no-sustituído explica los rasgos específicos del espectro de infrarrojo, mencionados arriba.

La identificación de los próximos dos compuestos (picos menores 6 y 7) sólo se basa en sus espectros de masas (p. 133), ya que no fué posible recuperar sus espectros de infrarrojo debido a insuficiente sensibilidad del detector. Después de la búsqueda en la biblioteca de espectros de masa de Wiley 138K, se sugirió que éstos compuestos son 2,3,5-trimetil- (peso molecular de 109) y 3-etil-2,5-dimetil-pirroles (peso molecular de 123), respectivamente. Sus espectros de masas tienen las bandas debidas a la pérdida de grupos metilo: de m/z 94 y 79 para el primero; 108 y 93 para el último.

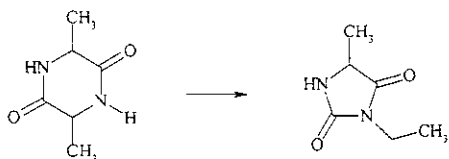
Los compuestos 5-7 son productos menores de la pirólisis y no representan las rutas importantes de descomposición térmica de la poli-Ala.

Los últimos tres compuestos identificados son N-heterociclos, que contienen grupos carbonílicos. El compuesto 10 es la PD de Ala, en su espectro de infrarrojo (p. 133) se encontró un pico $\nu_{\text{C=O}}$ a 1723 cm^{-1} y un pico ν_{NH} a 3424 cm^{-1} ; el espectro de masas tiene picos que corresponden al siguiente patrón de fragmentación:



Esta asignación se confirmó por inyección de la muestra estándar de PD de Ala, que presenta los mismos rasgos en sus espectros de masas e infrarrojo.

El compuesto 9 tiene el mismo peso molecular 142 (p. 133), como lo tiene la PD, pero su espectro de infrarrojo difiere significativamente: una banda $\nu_{C=O}$ a 1745 cm^{-1} y otra de ν_{NH} se encuentra a 3487 cm^{-1} . La posición de la banda de carbonilo hace pensar en una estructura de hidantoinas para éste producto de la pirólisis, el compuesto podría provenir de la isomerización de la PD a 3-etil-5-metilhidantoina, como fue sugerido anteriormente (Basiuk et al., 1998b).



Los iones de m/z 114 y 99 son resultantes de la pérdida de los fragmentos C_2H_5 y $HNCO$, respectivamente.

Finalmente, el compuesto 8 con una masa molecular de 127 (p. 133) y con un espectro de infrarrojo similar a los espectros de γ -lactamas N-no-sustituidas (el pico $\nu_{C=O}$ a 1757 y la absorción ν_{NH} a 3488 cm^{-1}), se identificó como trimetil-2-pirrolidinona. La posición exacta para los grupos metilo no se pudo determinar, la distribución lógica más simple es que ellos están cerca de los átomos C(3), C(4) y C(5).

En la pirólisis de poli-alanina los compuestos identificados son N-metil-, 2,3,5-trimetil-, 2-etil-4-metil- y 3-etil-2,5-dimetil-pirroles, 4-metil- y 2,6-dimetil piridinas, propanamida, trimetil 2-pirrolidinona, 3-etil-5-metilhidantoina y derivados de piperazín-2,5-diona de alanina. La formación de la mayoría de estos compuestos no puede explicarse de la manera tan sencilla como para las PDs y 2,4-imidazolidindionas (hidantoinas) (Munson and Vick, 1985; Munson and Petterolf, 1987; Voorhees et al., 1994; Basiuk et al., 1998b) y debe involucrar las reacciones con participación de radicales (reestructuraciones, rompimientos, recombinaciones, sustituciones, etc.), capaces de producir derivados N-alkilados e hidrocarburos que unen más de 2 átomos de carbono (5 en el caso de piridinas).

5.5.3 Productos de pirólisis de la poli-valina

El cromatograma de los productos condensados de la pirólisis de la poli-Val solubles en cloroformo se muestra en la Fig. 23. Los espectros de infrarrojo y de masas correspondientes a estos

compuestos se muestran en Fig. 7.5.3 (p. 134-137) del Apéndice 7.5, en donde los números de los espectros corresponden a los números de los picos en el cromatograma.

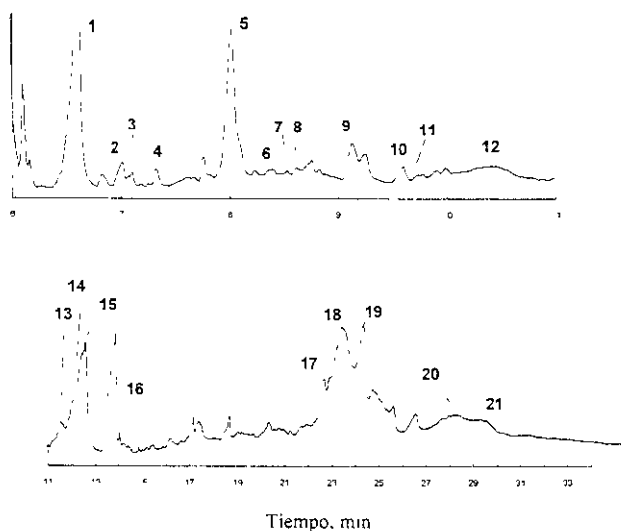
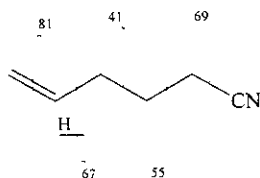


Fig. 23. El cromatograma de los productos de pirólisis de poli-valina.

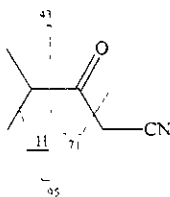
El pico 1 es debido a un producto, cuya presencia fue inesperada. Los datos, encontrados del espectro del infrarrojo (p. 134) se asemejan a los encontrados en la biblioteca EPA-REVA y corresponden a los isocianatos alifáticos simples, que también tienen bandas muy intensas a 2268 cm^{-1} . El tamaño del radical alifático puede ser establecido por el espectro de masas, donde el ión molecular es m/z 71: el pico puede corresponder al etil-isocianato. Los picos de m/z 69 y 56 pueden atribuirse a la pérdida de H_2 y CH_3 , respectivamente, de m/z 43, a la pérdida del grupo HNCO .

El producto 2 de la pirólisis exhibe una banda de infrarrojo de $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ a 2229 cm^{-1} (p. 134), otra banda de 1658 cm^{-1} típica para nitrilos aromáticos y $\nu_{\text{C}=\text{H}}$ aromática 2986 cm^{-1} . Esto indica que el compuesto puede ser benzonitrilo, lo cual se confirma por su espectro de masas que presenta un pico de m/z 103 y otro pico de m/z 77, que corresponde al fragmento fenilo, formado después de la pérdida del grupo CN . Por otro lado, la asignación del otro pico de m/z 81 es más problemática.

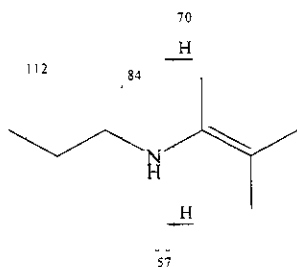
Para el compuesto 3, el espectro de infrarrojo no fue de buena calidad (p. 134) La característica notable es la presencia de la banda de nitrilos, pero a frecuencias más altas, a 2274 cm^{-1} lo cual indica que este nitrilo es alifático. Al mismo tiempo, la absorción débil a $3050\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ puede significar la presencia de un grupo vinilo en la molécula. Si el pico de m/z 95 es del ion molecular, se puede sugerir que el compuesto 3 contiene un ion m/z 41, característico para los nitrilos alifáticos ($+\text{HN}=\text{C}=\text{CH}_2$) y que este compuesto es el pentenonitrilo $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$, cuya fragmentación se explica de la siguiente manera:



La banda $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ a 2274 cm^{-1} en el espectro infrarrojo del producto 4 (p. 134) indica, que este producto es un nitrilo alifático, con otras dos importantes características espectrales: la primera es la banda ν_{CH} típica para los hidrocarburos ramificados, debido a la absorción fuerte del grupo metilo y la absorción reducida en la parte de frecuencias bajas (que corresponde a CH_2 y CH). La segunda, es la banda intensa cerca de 1700 cm^{-1} que puede interpretarse como absorción del grupo carbonilo. El pico más abundante en el espectro de masas es de m/z 111 que puede corresponder al siguiente nitrilo:

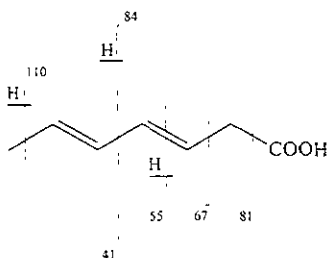


El compuesto 5 se identificó como amina secundaria insaturada. Las características del espectro infrarrojo (p. 134) que confirman ésta conclusión son la absorción ν_{NH} a 3550 cm^{-1} y una banda intensa de $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ a 1700 cm^{-1} . Aquí hay posibilidad de varios isómeros. El espectro de masas de una de las estructuras isoméricas probables puede explicarse por las siguientes rupturas.

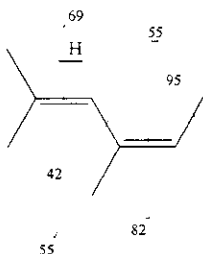


Sobre los picos menores 6 y 8 solo se pudo sugerir, en base de la comparación de sus espectros de masas (p. 135) con los de la biblioteca Wiley 138K (no se pudo obtener sus espectros de infrarrojo). El espectro del compuesto 6 se parece más al del 4-metil-piridina y del compuesto 8 al del 1,2-dimetil-benceno ó con su 1,3-isomero).

El producto 7 de la pirólisis corresponde a un ácido carboxílico insaturado conforme a su espectro de infrarrojo (p. 135). A esta conclusión apunta la banda ν_{OH} a 3576 cm^{-1} , la banda de carbonilo a frecuencias altas a 1771 cm^{-1} (típica para los ácidos carboxílicos en la biblioteca EPA-REVA), y las bandas a números de ondas más bajos, que pueden corresponder a bandas traslapadas $\nu_{C=C}$ y ν_{OH} , igual como la forma característica de ν_{CH} alrededor de 3000 cm^{-1} . En la base de los espectros mencionados y del espectro de masas (con el ion molecular a m/z 126), se sugirió que el compuesto es el ácido 3,5-heptadienoico con la fragmentación que corresponde al esquema siguiente:

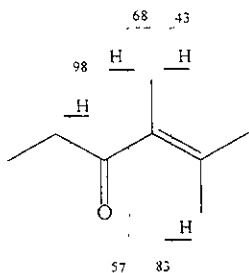


El espectro de infrarrojo del compuesto 9 es muy representativo, corresponde a un hidrocarburo insaturado (el pico $\nu_{C=C}$ a 1675 cm^{-1}) con absorción del grupo metilo (p. 135) después de 3000 cm^{-1} . Su espectro de masas contiene el ión molecular a m/z 110, que corresponde a un hidrocarburo C_8H_{14} . Hay posibilidad de muchos isómeros, uno de los cuáles explica bien la fragmentación que se observa en el espectro de masas



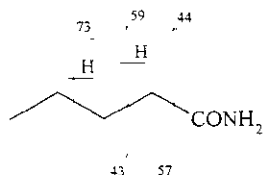
Para los compuestos 10 y 12 los espectros de masa e infrarrojo adquiridos son muy similares (p. 135). El espectro de infrarrojo es típico para alquil-piridinas. Además, los espectros de masas muy semejantes fueron encontrados en la biblioteca Wiley 138K: estos son 2,5-dimetil-piridina y su isómero 3,5. No se pudo determinar cuál de ellos corresponde al compuesto 10 y cuál al compuesto 12.

El espectro de infrarrojo del producto 11 de la pirólisis tiene las bandas (p. 136) sobrepuestas a $1650-1750\text{ cm}^{-1}$, que sugieren la presencia de los grupos $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}=\text{O}$ en la molécula. Analizando el espectro de masas, se consideraron varios isómeros posibles, por ejemplo, la siguiente cetona:

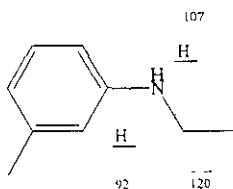


Un esqueleto de hidrocarburo relativamente grande puede hacer que la identificación del compuesto sea más complicada. Se detectaron dos productos más, el 13 y el 15, donde la determinación de la estructura se complica por esta razón. El compuesto 13 (p. 136) se parece a una cetona insaturada (las bandas $\text{C}=\text{C}$ a 1650 cm^{-1} y $\text{C}=\text{O}$ a 1750 cm^{-1}), pero para este compuesto solo se pudo proponer la fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}$ a partir de su espectro de masas (ión molecular de m/z 138). El compuesto 15 no contiene grupos carbonilo, mientras exhibe una absorción de $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ a 1671 cm^{-1} , por lo que se puede considerar una olefina. Su espectro de masas tiene un ión de m/z 152, que puede ser el ion molecular: en este caso (para muchos hidrocarburos el ion molecular no puede distinguirse) para este producto de la pirólisis se puede asignar la fórmula general $\text{C}_{11}\text{H}_{20}$.

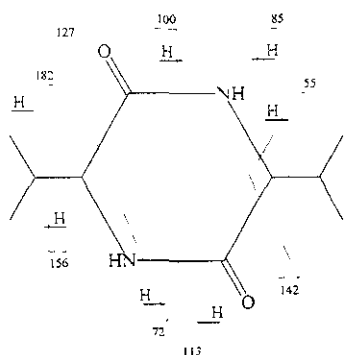
El compuesto 14 que aparece como el hombro del pico mayor 15, tiene todos los rasgos típicos del espectro de infrarrojo (p. 136) de una amida, en particular las bandas de $\nu_{C=O}$ y ν_{NH} a 1730 y 591 cm^{-1} , respectivamente, y dos bandas ν_{NH} a 3433 y 3563 cm^{-1} . Según la biblioteca EPA-LEVA éste producto es valeramida. La búsqueda en la biblioteca Wiley 138 K produjo un resultado similar. El espectro de masas puede interpretarse de la siguiente manera:



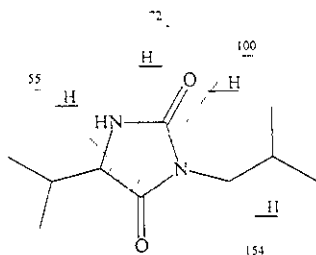
La naturaleza aromática del producto 16 (p. 136) puede sugerirse de la forma de la banda ν_{CH} en la región de 3000 cm^{-1} , encontrada en muchos bencenos sustituidos. La característica notable es la presencia de absorción ν_{NH} a 3491 cm^{-1} típica para aminas secundarias. Esta asignación se confirma con el espectro de masas de la N-etil-3-metil-benzenamina según la biblioteca Wiley 138K (ion molecular de m/z 135). Su fragmentación puede ser explicada de la siguiente manera:



El compuesto 20 es la PD de valina que se identificó mediante del estándar. En el cromatograma la PD de Val aparece como 2 bandas amplias debido a la racemización de los fragmentos de valina a temperatura alta (los diastereoisómeros LL/DD y DL tienen tiempos de retención notablemente diferentes) y baja volatilidad, como en la mayoría de las PDs. Las características de sus espectros de infrarrojo (p. 137) son: el pico de absorción $\nu_{C=O}$ a 1717 cm^{-1} ("amida I"; mientras la absorción de "amida II" alrededor de 1550 cm^{-1} no aparece, como en otras amidas cíclicas) y la absorción ν_{NH} a 3425 cm^{-1} . Los picos más importantes observados en el espectro de masas son debidos a la siguiente fragmentación:



Un derivado de la hidantoína de Val aparece como el pico 19 y tiene masa molecular (p. 137) igual a la de la PD (ión molecular de m/z 198). Las características de la hidantoína en su espectro de infrarrojo son dos bandas de $\nu_{C=O}$ a 1745 y 1802 cm^{-1} y la banda ν_{N-H} a 3484 cm^{-1} . Los iones de su espectro de masas son debidos a la siguiente fragmentación:



Una ruta posible para la formación de las hidantoínas 5-sustituídas, fué propuesta (Munson and Vick, 1985; Munson and Petterolf, 1987) a través de la ruptura dentro de la cadena polipeptídica. Al mismo tiempo, la formación del compuesto 19 (3-isobutil-5-isopropil-hidantoína) requiere de una N-alkilación. Aunque este proceso en principio, puede observarse simultáneamente con la ruptura dentro de la cadena (Munson and Vick, 1985; Munson and Petterolf, 1987), también tiene que aparecer la hidantoína sin sustituyente o el N-isobutilico. Ya que no se les encontró, se sugirió que la hidantoína 19 se formó por la isomeración de la PD de Val, que es un proceso pirolítico secundario

En los estudios realizados por (Basiuk and Navarro-González, 1997, Basiuk et al., 1998a-c, Basiuk, 1998), las amidinas bicíclicas (BCA ó imidazo[1,2-a]piperazin-3,6-dionas) fueron identificadas junto con los productos de su degradación utilizando las mismas técnicas acopladas. En el presente caso, la amidina bicíclica de la valina tiene un peso molecular de 279. En ningún

espectro de masas fué encontrado el ion de m/z 279. Sin embargo, varios de ellos como los compuestos 17, 18 y 21 con iones de m/z 236, 236 y 235, respectivamente, tienen iones moleculares (p. 137) con m/z más altos de los que tienen las PDs, con el peso molecular de 198. La masa de 236 es por 43 unidades más baja que la de la amidina bicíclica de Val, que pierde HNCO de la BCA. Pero en este caso es imposible explicar el siguiente hecho: (1) ¿Por qué los productos 17 y 18 tienen diferencias significantes en los espectros de IR, especialmente tomando en cuenta las bandas de absorción $\nu_{C=O}$? y (2) ¿Por qué los grupos NH se quedaron en las moléculas (las bandas ν_{NH} a 3485 and 3483 cm^{-1} , respectivamente)? De esta manera, su naturaleza química exacta no está clara, y solo se pudo suponer que los compuestos 17 y 18 contienen los fragmentos estructurales de *cis*-amidas (no *trans*-amidas, ya que la absorción ν_{NH} a 1550 cm^{-1} está ausente).

Respecto del último compuesto 21, no se pudo obtener su espectro de infrarrojo (p. 137) de buena calidad. Basándose en el pico de m/z 235, se puede suponer que el compuesto esté formado de la amidina bicíclica a través de la eliminación del sustituyente α -isopropílico (como isopropano), sin embargo, con los datos disponibles no existen argumentos firmes para la caracterización del compuesto 21.

El análisis de las rutas de la pirólisis es muy complicado, sobre todo cuando están involucradas especies orgánicas relativamente complejas. Algunos intentos para explicar la formación de productos N-heterocíclicos de la pirólisis de polipéptidos han sido realizados por varios investigadores. En particular, el rompimiento del fragmento N-términal de dipéptidos con su ciclación simultánea fué sugerido por Voorhees y colaboradores (1994) como una de las rutas probables hacia las PDs. Otra posible ruta es el rompimiento dentro de la cadena, que no involucra los fragmentos de aminoácidos terminales (Munson and Vick, 1985; Munson and Petterolf, 1987). Los mismos investigadores propusieron una posible ruta de obtención de 5-alkuil-2,4-imidazolidindionas, también a través del rompimiento dentro de la cadena. Un representante de esta clase de compuestos es la 3-etil-5-metilhidantoína (compuesto 9 de la pirólisis de poli-Ala), sin embargo, su formación necesita de una N-etilación. Aunque la última reacción podría proceder simultáneamente con el rompimiento dentro de la cadena (según Munson et al.), también debería observarse un precursor N-no-etilado de la hidantoína. En el presente trabajo no se le encontró y se piensa que la 3-etil-5-metilhidantoína se forma a través de la isomerización de la PD.

Con respecto a las 3,5-alkuil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2,4-dionas y las 3-alkuenil-5-alkuil-pirrolidin-2,4-dionas (Boon and Lecuw, 1987), se encontró su formación solamente para la valina

en presencia de silicagel (compuesto 15). La ausencia de estos compuestos dentro de otros casos analizados se puede explicar por la diferencia de los métodos de la pirólisis utilizados en el estudio presente con los métodos que utilizaron Boon y Leeuw. En el caso de presente estudio la pirólisis "fuera de línea" y el tiempo de equilibrio más grande, permitió obtener los compuestos tanto primarios, como secundarios de la pirólisis de aminoácidos y poli-aminoácidos (Fig 1) y obtener los productos de reacciones entre las moléculas (PD, BCA y TCA), los cuales presentan la mayoría entre los compuestos analizados.

6. CONCLUSIONES

El objetivo principal del presente trabajo fue el estudio de la pirólisis de algunos compuestos biológicos (aminoácidos, purinas y pirimidinas) a temperaturas pirolíticas y la identificación de los productos de la pirólisis de valina y leucina en la presencia de silicagel y de los poli-aminoácidos que permitan la discusión de sus implicaciones para el origen de la vida (la entrega extraterrestre de las moléculas biológicas a la Tierra Primitiva). Según los resultados obtenidos de los estudios de pirólisis a las temperaturas entre 400 y 1000°C, la mayoría de los aminoácidos presentan una estabilidad térmica considerable y tienen posibilidad de sobrevivir (hasta 10% de la materia prima) el calentamiento de los cuerpos extraterrestres que tiene lugar durante el pasaje atmosférico a temperaturas de 500 a 600°C. Sin embargo, con una protección típica para los meteoritos, la supervivencia de los aminoácidos alcanzaría los niveles más elevados.

Para las purinas y pirimidinas, las temperaturas entre 400 y 600°C son óptimas para la supervivencia que va de 1 a 10%.

Durante el calentamiento de los aminoácidos se forman compuestos con peso molecular más alto, tales como las piperazindionas, hidantoinas y amidinas bi- y tricíclicas, los cuales conservan los fragmentos intactos de los aminoácidos. Las temperaturas elevadas causan la formación de las mezclas racémicas de dicetopiperazinas. Hasta cierto punto estos resultados pueden explicar la presencia de las mezclas racémicas de los compuestos orgánicos identificados en los meteoritos. Esto significa que la racemización puede ocurrir durante el pasaje atmosférico y de la entrada de los cuerpos extraterrestres en la superficie terrestre.

Las atmósferas de CO₂ y de N₂ utilizadas para simular las atmósferas en la Tierra Primitiva, no muestran una diferencia notable en los resultados de la pirólisis, los valores de la supervivencia de los compuestos orgánicos son prácticamente los mismos bajo estas atmósferas.

La pirólisis de los aminoácidos valina y leucina, como representantes de los aminoácidos, en presencia y en ausencia de silicagel, demuestra que SiO₂ tiene un efecto catalítico notable en la producción de las dicetopiperazinas. Al mismo tiempo, la recuperación de los aminoácidos disminuye con la presencia de silicagel. Sin embargo, el tiempo de contacto de un aminoácido vaporizado con la silicagel es relativamente corto e insuficiente para la producción de las dicetopiperazinas en cantidades sustancialmente mayores que sin silicagel. Este efecto catalítico puede ser más notable para los compuestos orgánicos en los cuerpos espaciales durante su entrega a la Tierra.

Todo esto significa que el papel de los cuerpos extraterrestres en la entrega de moléculas orgánicas simples puede ser muy importante, si tomamos en cuenta las cantidades de sedimentación del polvo extraterrestre y de otros cuerpos espaciales. Además, estas cantidades podrían ser mucho más significantes en la Tierra Primitiva durante los "bombardeos" por los meteoritos, asteroides y cometas en una atmósfera anóxica con la presión atmosférica de 10 bar.

Entre los productos menos volátiles de la pirólisis de valina a temperatura de 500°C en la presencia de silicagel se pueden proponer las estructuras de: dos ácidos carboxílicos, tres amidas, una hexamida, 3,4-diisopropil- β -propiolactamo, 2,6-dietiltoluidina, 2-isopropil-5-etil-piperazina, dos imidazolonas, una dicetopiperazina, tres dipéptidos de valina, 3,5-diisopropil-pirrolidin-2,4-diona y las amidinas bicíclicas de valina.

Entre los productos de la pirólisis de leucina identificados tentativamente a las mismas condiciones se proponen: tres aminas, cinco hidrocarburos saturados y un insaturado, tres cetonas alifáticas y una cíclica, isovaleramida, un aldehído, una amidina bicíclica y sus productos de deshidratación, deshidrogenación y pérdida de los sustituyentes alifáticos.

El efecto catalítico de silicagel permite obtener la mayor cantidad y diversidad de los compuestos con un mayor peso molecular durante la pirólisis de los aminoácidos. Al mismo tiempo, disminuye la cantidad de los aminoácidos recuperados.

Los productos identificados tentativamente de la pirólisis de poli-glicina a temperatura de 500°C son compuestos nitrogenados: acetamida, dimetil-2-pirrolidinona, N-metil-succinimida, un derivado de piperazindiona de glicina y el ácido barbitúrico.

En la pirólisis de poli-alanina a las mismas condiciones se pueden proponer las estructuras de: cuatro pirroles, dos piridinas, propanamida, una pirrolidinona, una hidantoina y los derivados de piperazindiona de alanina.

Respecto a la pirólisis de poli-valina a las mismas condiciones, fueron identificados tentativamente 18 productos: un isocianato, un ácido carboxílico insaturado, dos cetonas, tres hidrocarburos insaturados, tres nitrilos, tres amidas (alifáticas y cíclicas) y cinco aminas.

La pirólisis de las moléculas biológicas produce varios compuestos orgánicos simples, como hidrocarburos, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, aminas, nitrilos, etc., que no pueden ser involucrados directamente en la química prebiótica de los aminoácidos y péptidos.

Comparando los resultados para poli-Val con la composición de los productos menos volátiles de la pirólisis de poli-Gly y poli-Ala, donde la mayoría de los compuestos son aminas y amidas

cíclicas. uno puede concluir que la diferencia entre estos dos casos es la presencia del isocianato, nitrilos insaturados, cetonas e hidrocarburos en la fracción menos volátil de productos de la pirólisis de poli-Val. Esto no se puede atribuir a la diferencia de las rutas pirolíticas para tres poli-aminoácidos estudiados. Una explicación razonable es que los productos de la pirólisis de poli-Gly y poli-Ala son más volátiles en comparación con los de la pirólisis de poli-Val y no se condensan bajo las condiciones experimentales utilizadas: especialmente esto es cierto para los hidrocarburos.

En cuanto a los compuestos cíclicos, la tendencia general en el caso de la poli-valina es la formación de los sistemas aromáticos (en particular, bencenos y piridinas sustituidas), mientras que la mayoría de los productos cíclicos de la pirólisis de poli-Gly y poli-Ala son mono-N-heterociclos de 5-miembros (pirrolidinas y pirroles sustituidos).

Para los productos de la pirólisis de los aminoácidos valina y leucina en la presencia de silicagel y de los poli-aminoácidos la ruta mayor es la formación de las PD de los aminoácidos bajo la doble deshidratación térmica, deshidrogenación, desalquilación, reestructurización en hidantoinas, pérdida de NHCO , etc. Otra ruta importante es la formación de las amidinas bicíclicas, seguida por deshidratación, deshidrogenación, desalquilación y la pérdida de NHCO . La identificación de los dipéptidos entre los productos de la pirólisis muestra que la formación de las PD pasa por la etapa de deshidratación sencilla con la producción de dipéptidos lineales antes de la formación de los dipéptidos cíclicos.

La formación de la mayoría de los compuestos analizados no puede explicarse de la manera tan sencilla como para las PDs e hidantoinas, e involucra las reacciones con participación de los radicales (reestructuración, rompimiento, recombinación, sustituciones, etc.), capaces de producir derivados N-alkilados e hidrocarburos que unen más de 2 átomos de carbono.

Los resultados obtenidos durante la pirólisis de los poli-aminoácidos tienen implicaciones importantes para la química prebiótica. Los niveles de supervivencia de los aminoácidos, los cuales se encuentran en los cuerpos cósmicos en forma de polímeros, parecidos a los poli-aminoácidos, son bastante altos y podrían contribuir en la aparición de la vida en la Tierra Primitiva, originada por la entrega extraterrestre de las moléculas orgánicas en los "vehículos" extraterrestres: a través de la formación (en niveles más altos que la supervivencia de aminoácidos) de los derivados de aminoácidos (dicetopiperazinas, hidantoinas, amidinas bi- y triciclas), los cuales conservan a los fragmentos de los aminoácidos intactos y pueden recuperarlos bajo condiciones de hidrólisis

7. APENDICES

7.1. Cromatogramas de los productos de pirólisis de algunos aminoácidos y bases de ácidos nucleicos a temperatura de 500 °C

Fig. 7 1.1 Cromatograma (HPLC) de los productos de pirólisis del uracil (la columna de 150 mm; fase móvil: agua y flujo 2 ml/min)

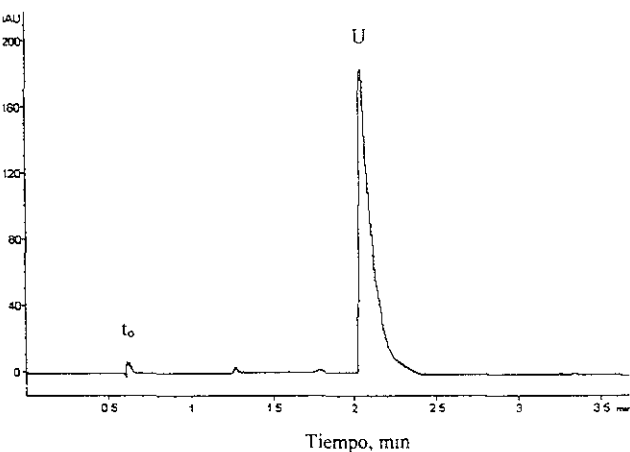


Fig. 7 1.2 Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis de la adenina (la columna de 250 mm; fase móvil: agua y flujo 2 ml/min)

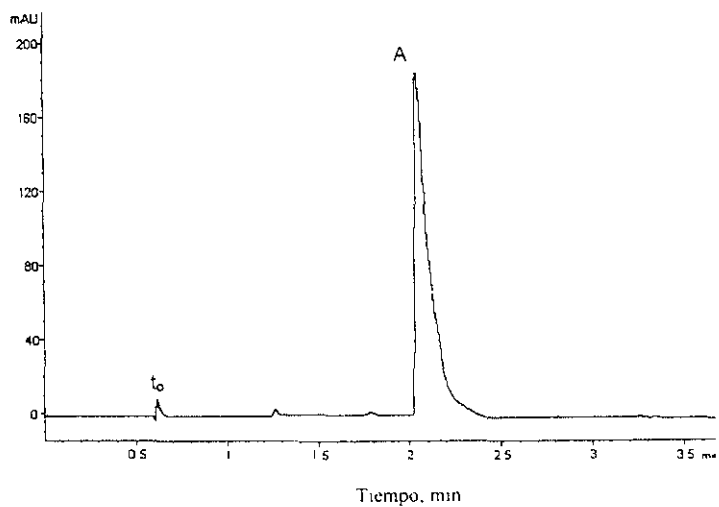


Fig. 7 1.3 Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis de la glicina (columna. 250 mm, fase móvil. agua y flujo. 1ml/min)

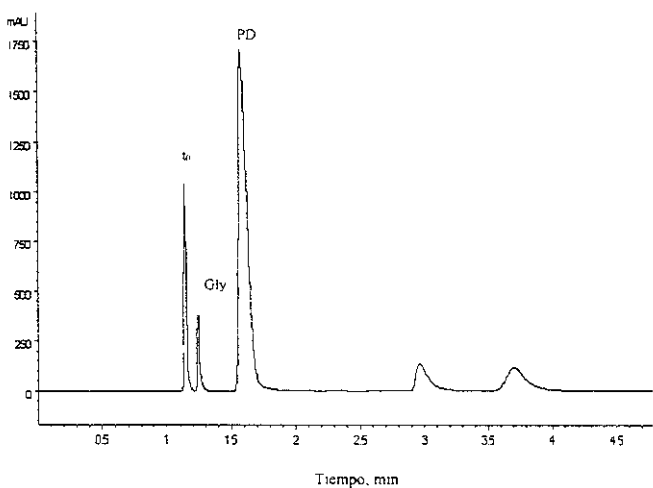


Fig 7 1.4. Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis de la prolina (columna de 250 mm; fase móvil: una mezcla de agua-metanol 80.20 (w/v) y flujo 2ml/min)

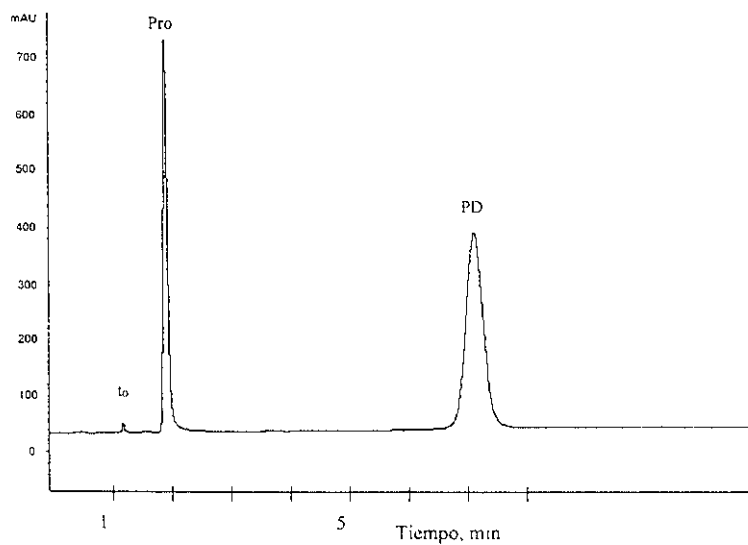


Fig. 7 1.5 Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis del ácido α -aminoisobutírico (columna de 250 mm; fase móvil agua y flujo 1 ml/min)

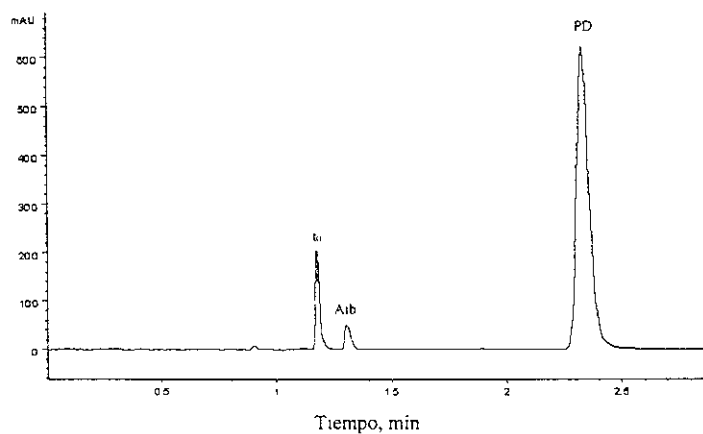


Fig. 7 1 6 Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis de los ácidos glutámico (1 3 min) y píroglutamico (1,8 min) (columna de 250 mm, fase móvil 0 1% solución acuosa de TFA y flujo 1 ml/min)

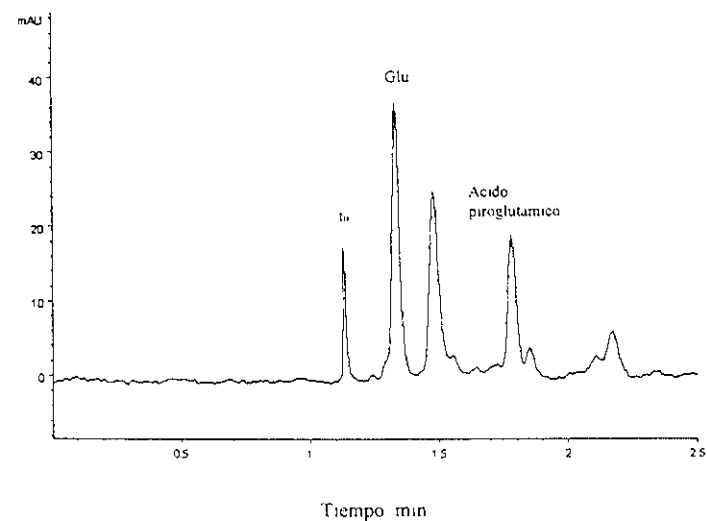


Fig 7 1 7 Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis de la fenilalanina (2.8 min) (columna de 250 mm; fase móvil solución acuosa 0 1% de TFA-MeOH 80.20 (v/v) y flujo. 2ml/min)

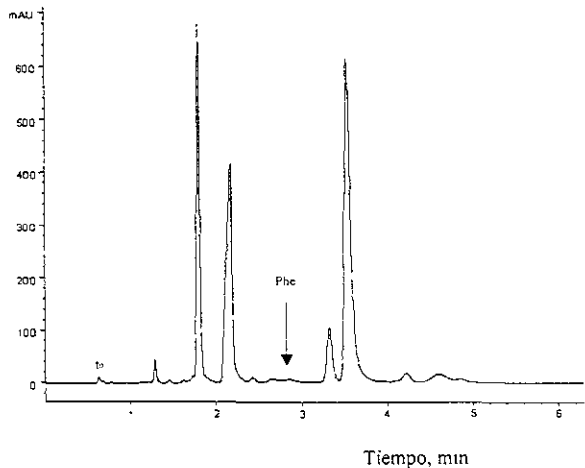


Fig 7 1 8. Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis de la alanina (columna de 250 mm. fase móvil agua y flujo 1ml/min)

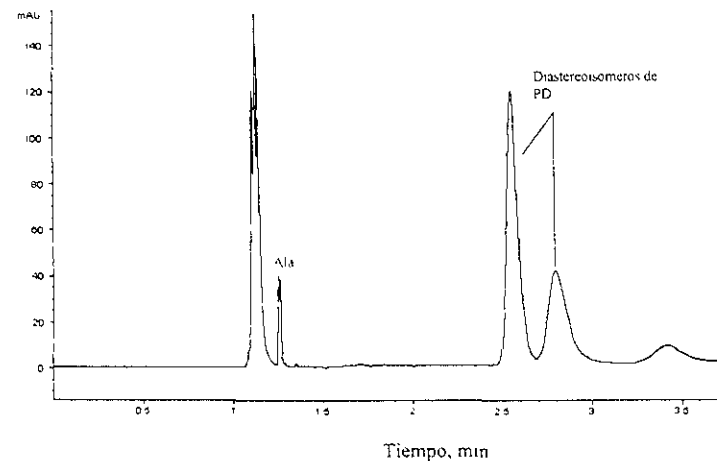
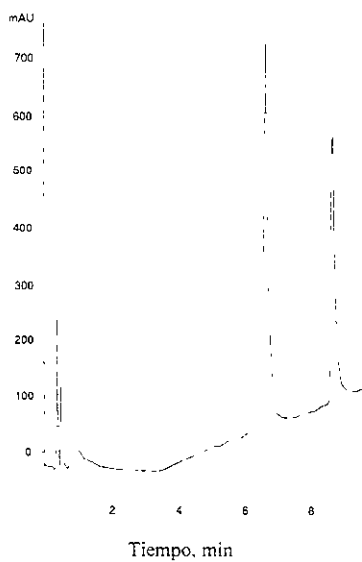


Fig 7 1.9 Cromatograma (HPLC) de los productos de la pirólisis de la valina (columna de 100 mm; fase móvil. gradiente de H₂O-MeOH de 0% a 100% en 20 min y flujo. 1ml/min)



7.2. Resultados de recuperación de algunos aminoácidos, sus PDs y las bases de los ácidos nucleicos a temperaturas (T) de 400 a 1000 °C
(y - área de los picos en el cromatograma)

Tabla 7.2.1. Resultados de recuperación de la glicina y de la PD de glicina a temperaturas (T) de 400 a 900 °C
(y - Área del pico en el cromatograma;
 Δy - promedio de área del pico en tres réplicas)

T, (°C)	Glicina (y)	Δy	Recuperación (%)	PD (y _i)	Δy_i	Recuperación (%)
400	38	38	3.7	1346	1368	4.6
	40			1406		
	37			1353		
500	38	36	3.5	2561	2562	8.6
	38			2564		
	33			2560		
600	9	8	0.8	3077	3065	10.3
	7			3056		
	7			3062		
700	0	0	0	958	955	3.2
	0			951		
	0			956		
800	0	0	0	150	145	0.5
	0			147		
	0			138		
900	0	0	0	10	11	0.1
	0			14		
	0			8		

* Los resultados menores de 0.1% se igualaron a 0%.

Tabla 7.2 2 Resultados de recuperación de la leucina y la PD de leucina a temperaturas (T) de 400 a 800 °C

T, (°C)	Leucina (y)	Δy	Recuperación (%)	PD (y _i)	Δy_i	Recuperación (%)
400	91	114	3.3	1482	1610	7.9
	162			1676		
	90			1671		
500	102	103	3.0	532	519	0.4
	105			501		
	102			524		
600	54	53	1.5	75	83	0
	50			80		
	55			94		
700	22	21	0.6	0	0	0
	21			0		
	19			0		
800	0	0	0	0	0	0

Tabla 7.2.3. Resultados de recuperación de la adenina a temperaturas (T) de 400 a 1000 °C

T, (°C)	Adenina (y)	Δy	Recuperación (%)
400	14803	14722	25.0
	14479		
	14885		
500	6410	6445	10.6
	6128		
	6197		
600	14869	14769	25.0
	14685		
	14753		
700	9142	9006	15.2
	8991		
	8885		
800	4402	4392	7.4
	4407		
	4368		
1000	98	90	0.2
	75		
	97		

Tabla 7.2.4. Resultados de recuperación del uracil a temperaturas (T) de 400 a 800 °C

T, (°C)	Adenina (y)	Δy	Recuperación (%)
400	296	294	0.6
	309		
	287		
500	10089	10080	19.3
	10080		
	10072		
600	14416	14472	27.8
	14516		
	14483		
700	2792	2894	5.6
	2926		
	2965		
800	152	148	0.03 = 0*
	146		
800	148		

* Los resultados menores de 0.1% se igualaron a 0%.

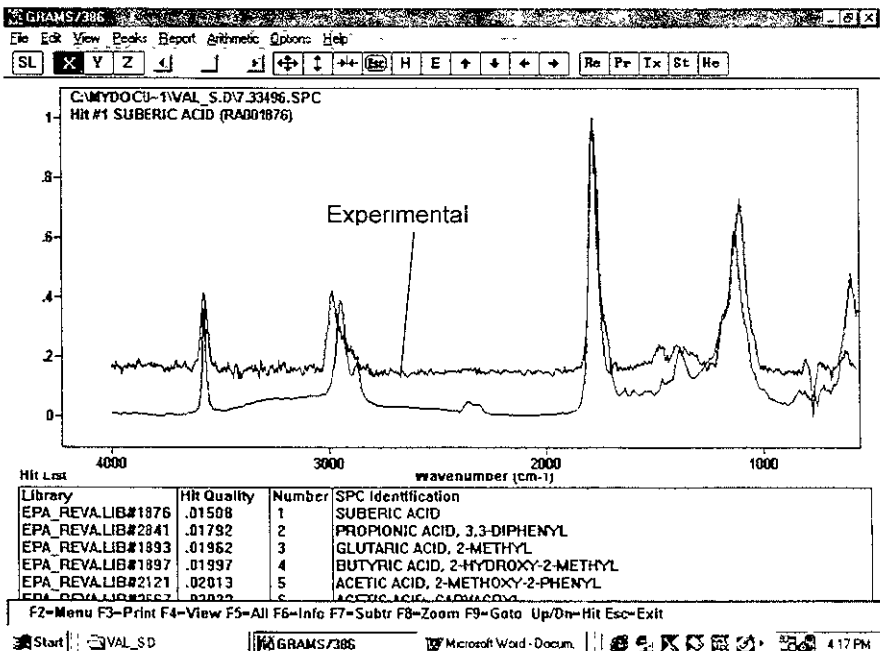
Tabla 7.2.5. Resultados de recuperación de la citosina a temperaturas (T) de 400 a 800 °C

T, (°C)	Adenina (y)	Δy	Recuperación (%)
400	47	47	0.1
	50		
	44		
500	223	223	0.6
	220		
	226		
600	209	209	0.6
	208		
	211		
700	76	76	0.2
	74		
	78		
800	20	20	0.04 = 0*
	26		
	14		

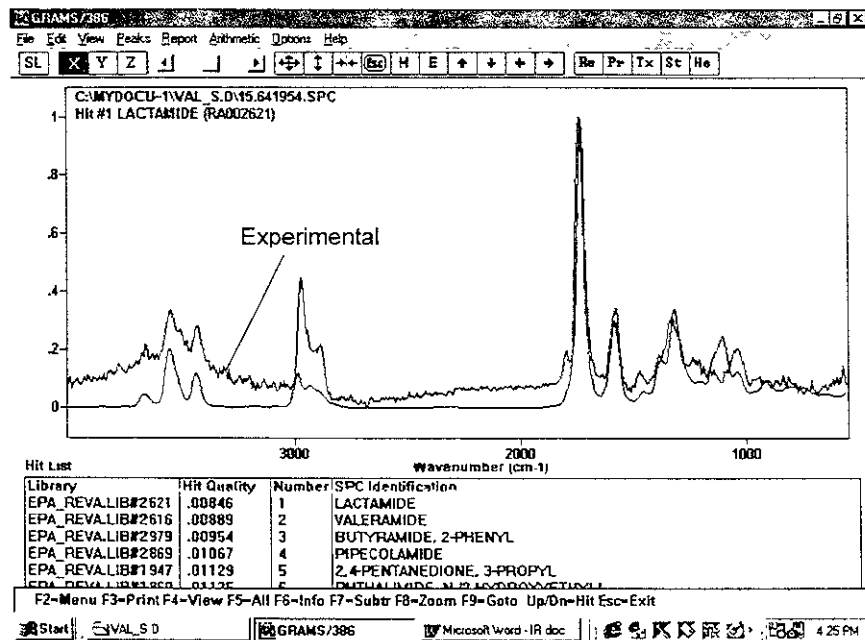
* Los resultados menores de 0.1% se igualaron a 0%.

7.3. Resultados de la búsqueda de los datos en las bibliotecas EPA-REVA y Wiley 138K para los compuestos selectos

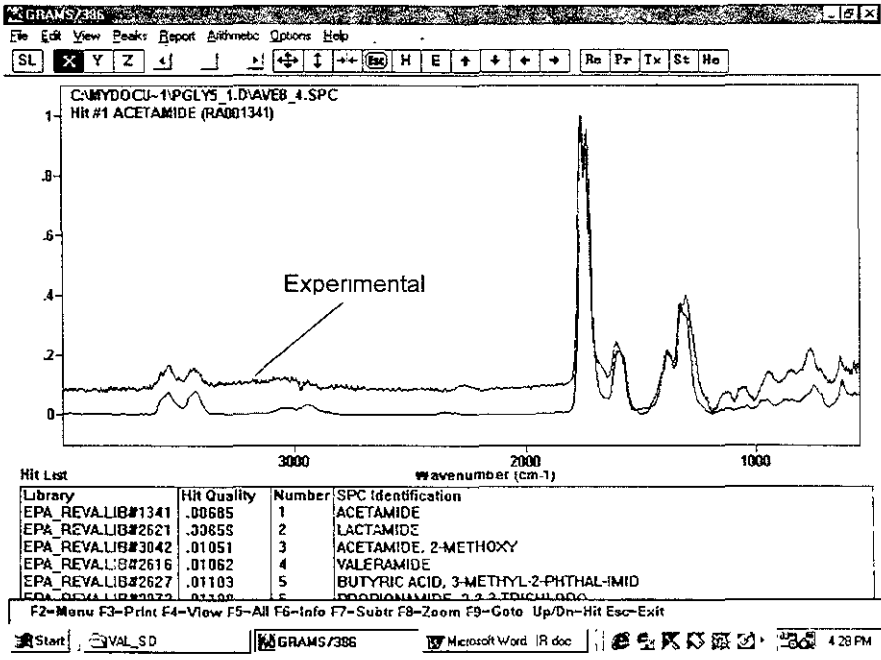
7.3.1. Espectro de infrarrojo del compuesto 1 en el cromatograma de la valina en presencia de SiO₂



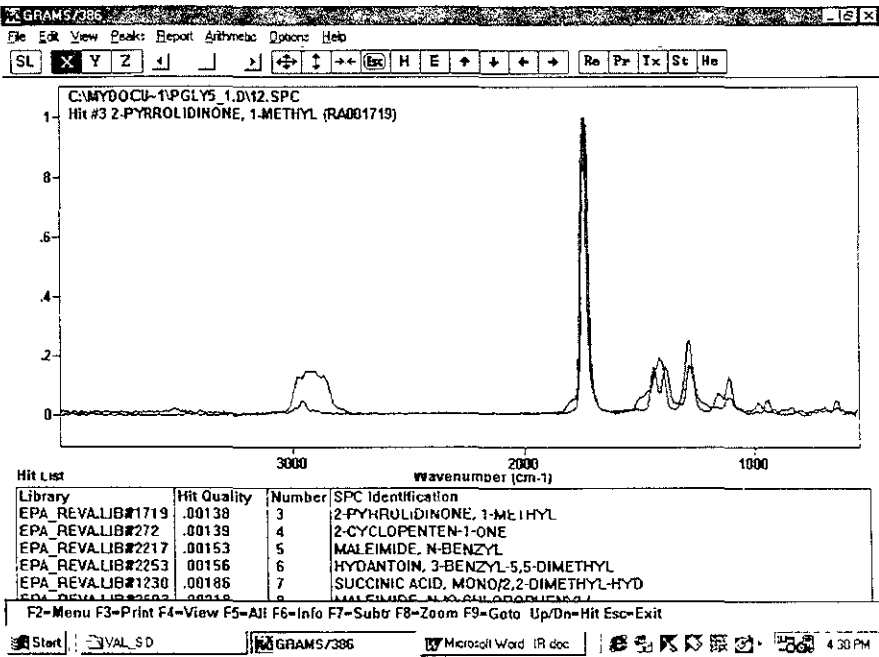
7.3.2. Espectro de infrarrojo del compuesto 6 en el cromatograma de la valina en presencia de SiO₂



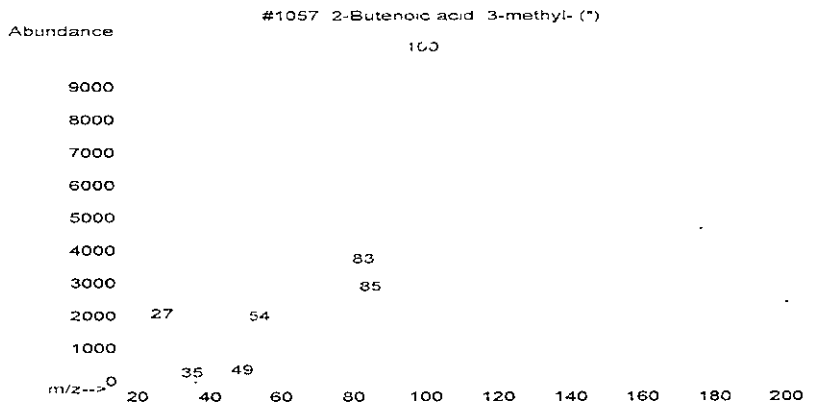
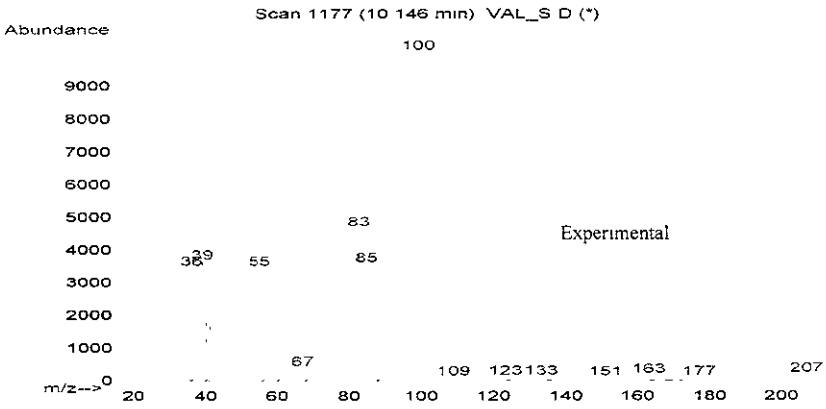
7.3 3. Espectro de infrarrojo del compuesto 1 en el cromatograma de la poli-glicina



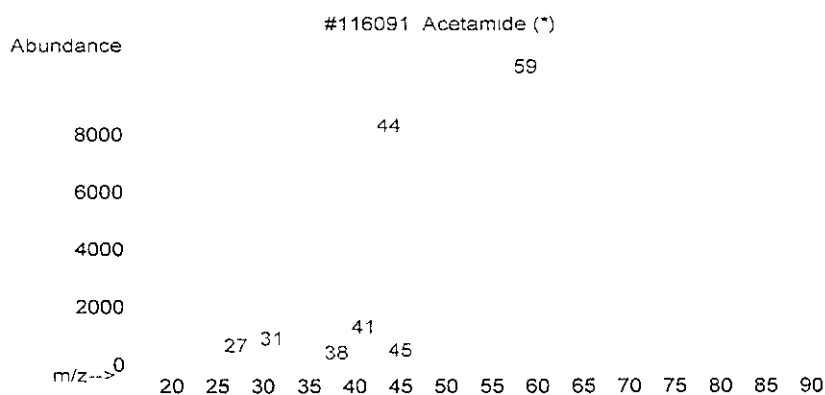
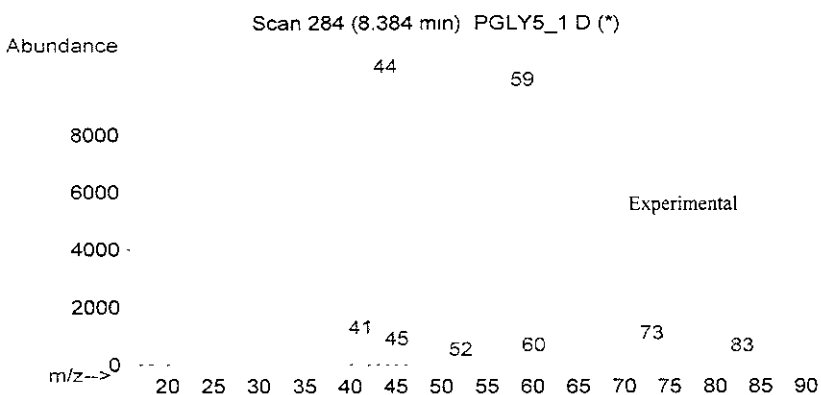
7.3.4. Espectro de infrarrojo del compuesto 2 en el cromatograma de la poli-glicina



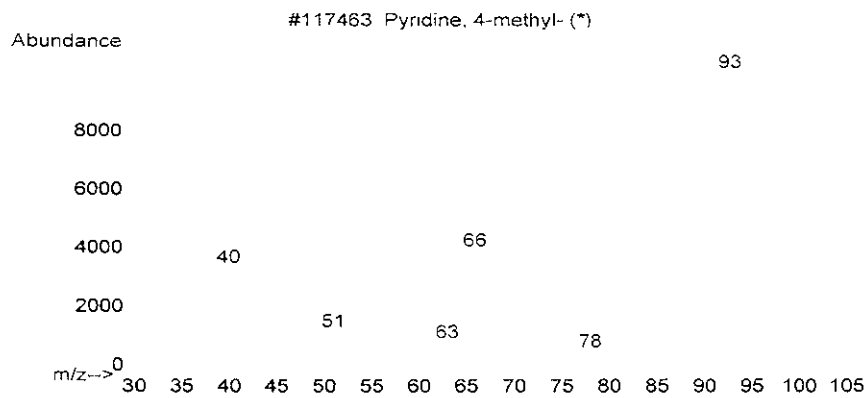
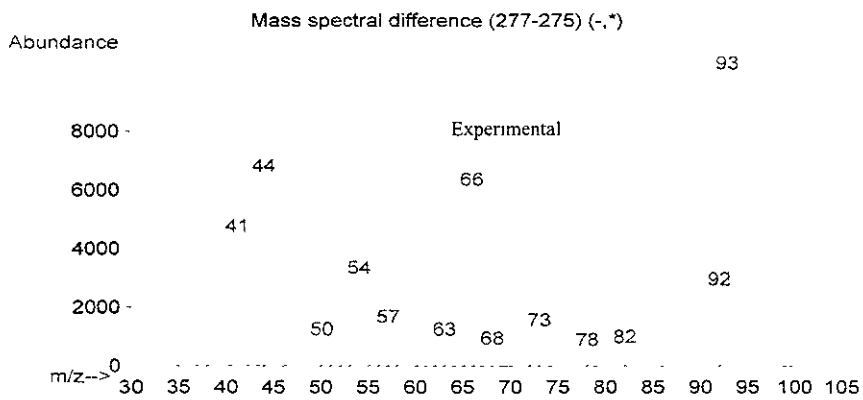
7.3.5. Espectros de masas del compuesto 4 en el cromatograma de la valina en presencia de SiO₂ (experimental y de la biblioteca Wiley 138K)



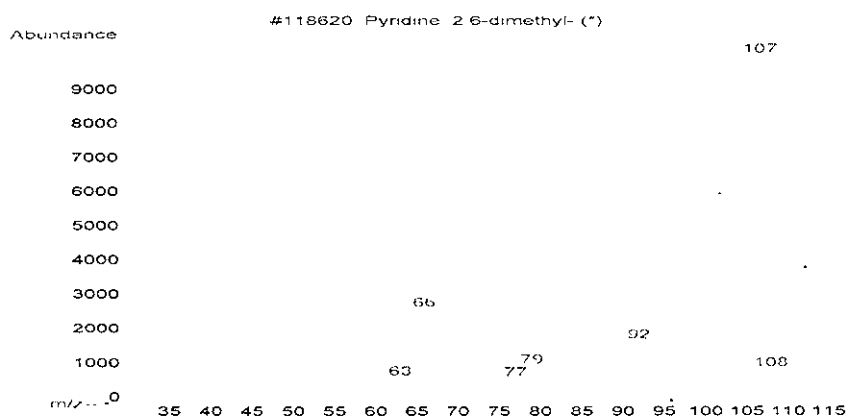
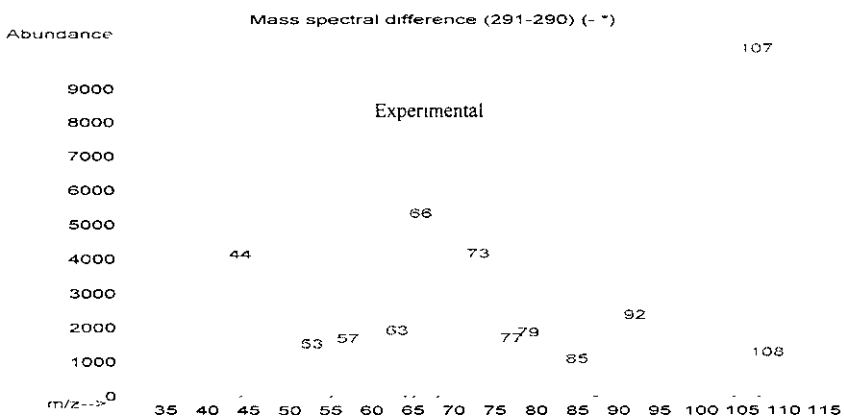
7.3.6. Espectros de masas del compuesto 1 en el cromatograma de poli-glicina (experimental y de la biblioteca Wiley 138K)



7.3.7. Espectros de masas del compuesto 2 en el cromatograma de poli-alanina (experimental y de la biblioteca Wiley 138K)



7.3.8. Espectros de masas del compuesto 3 en el cromatograma de poli-alanina
(experimental y de la biblioteca Wiley 138K)



7.4. Espectros de masas e infrarrojo de los compuestos, formados por la pirólisis de valina y leucina en presencia de silicagel

Fig. 7.4.1. Los espectros de infrarrojo de los productos de pirólisis de valina en presencia de silicagel

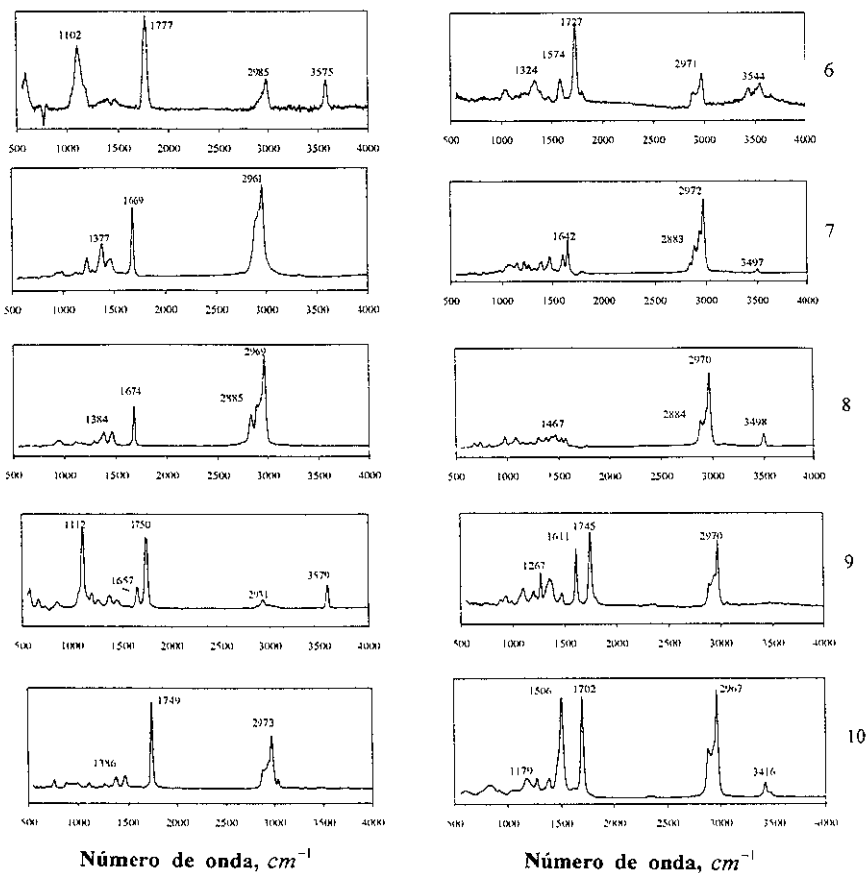
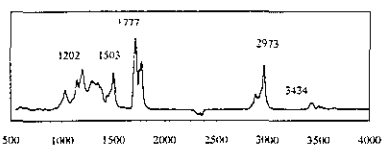
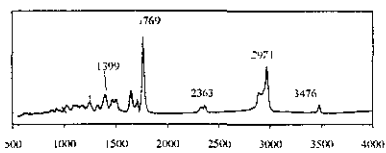
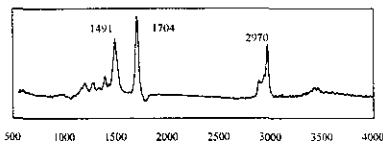
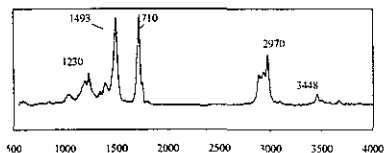


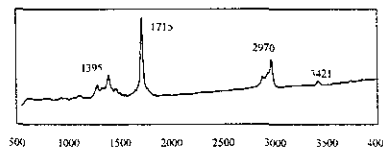
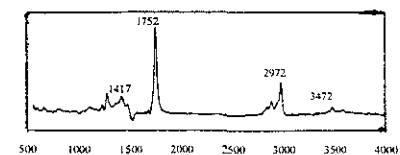
Fig. 7.4.1. (continuación)



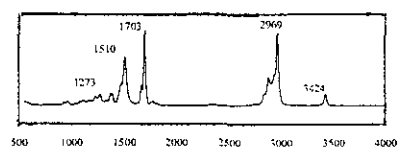
16



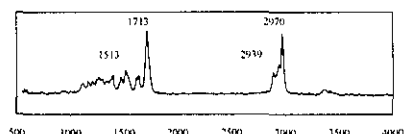
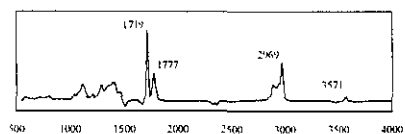
17



18

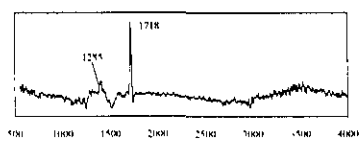


19

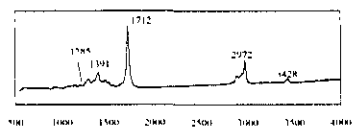


20

21



22



Número de onda, cm^{-1}

Fig. 7.4.2. Los espectros de infrarrojo de los productos de pirólisis de leucina en presencia de silicagel

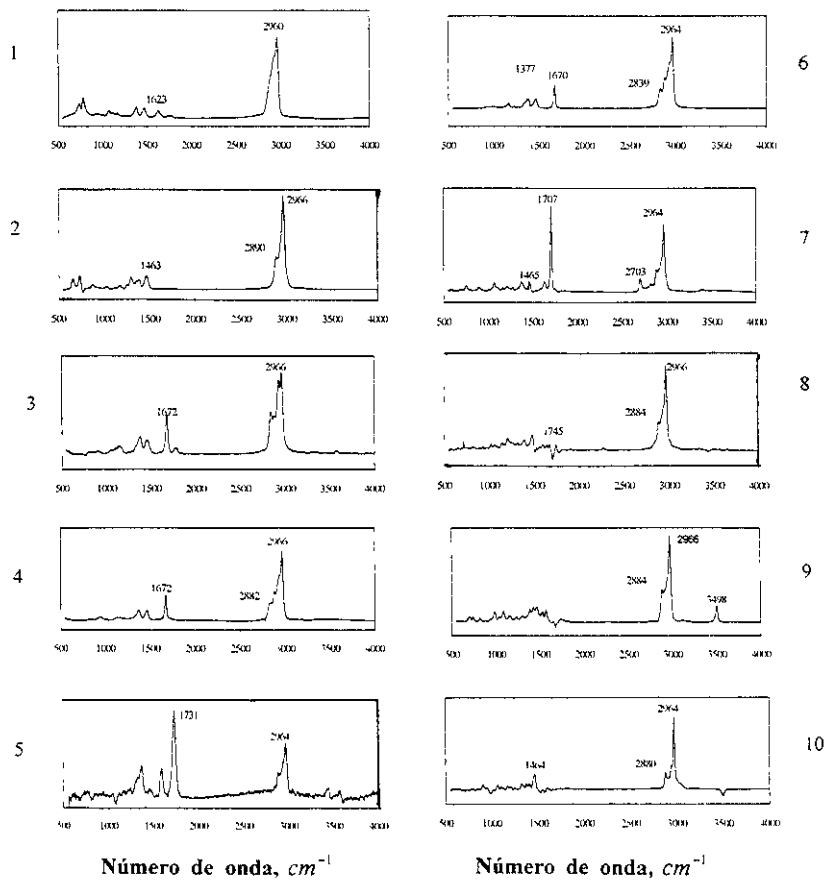


Fig. 7.4.2. (continuación)

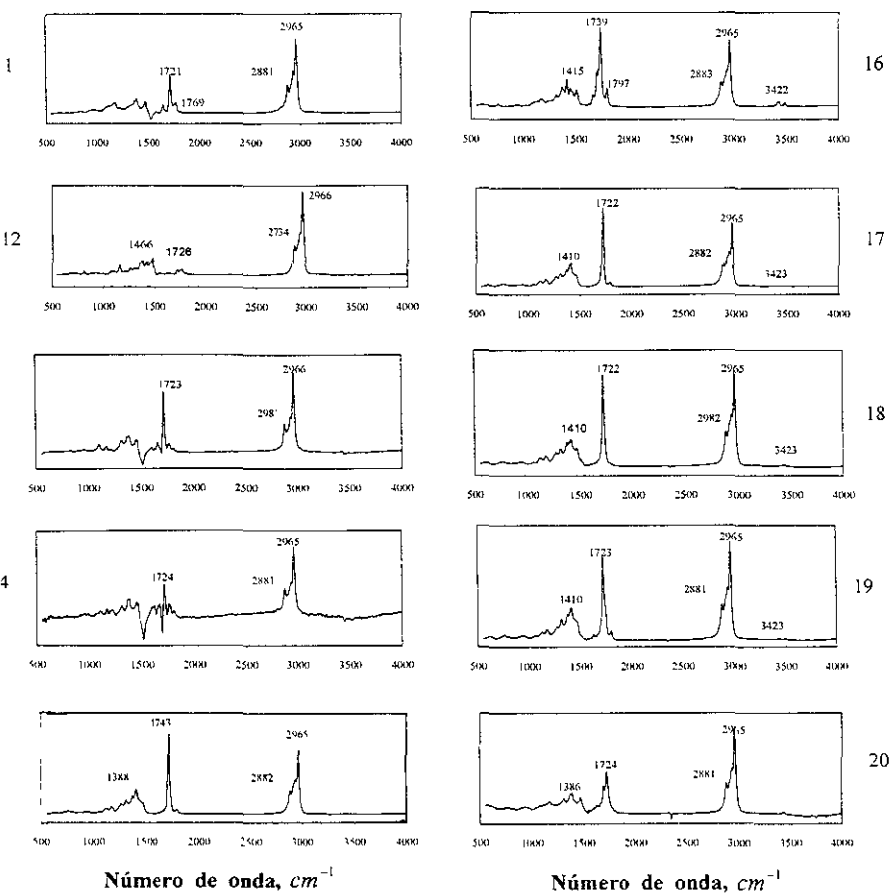
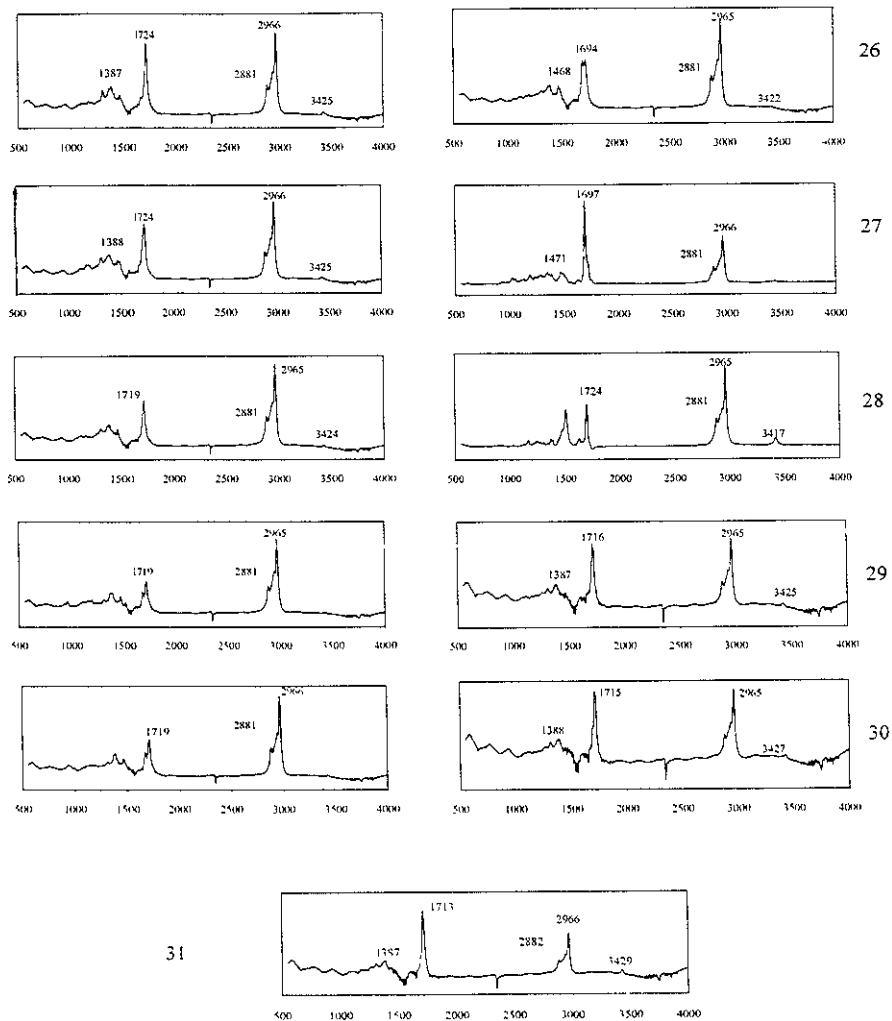


Fig. 7.4.2. (continuación)



Número de onda, cm^{-1}

Fig. 7.4.3. Los espectros de masas de los productos de pirólisis de valina en presencia de silicagel

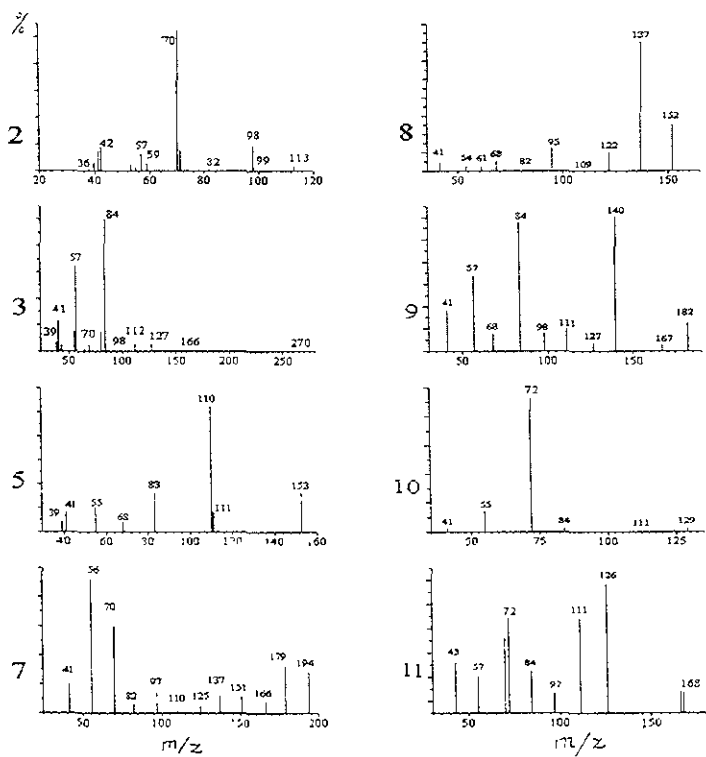


Fig. 7.4.3. (continuación)

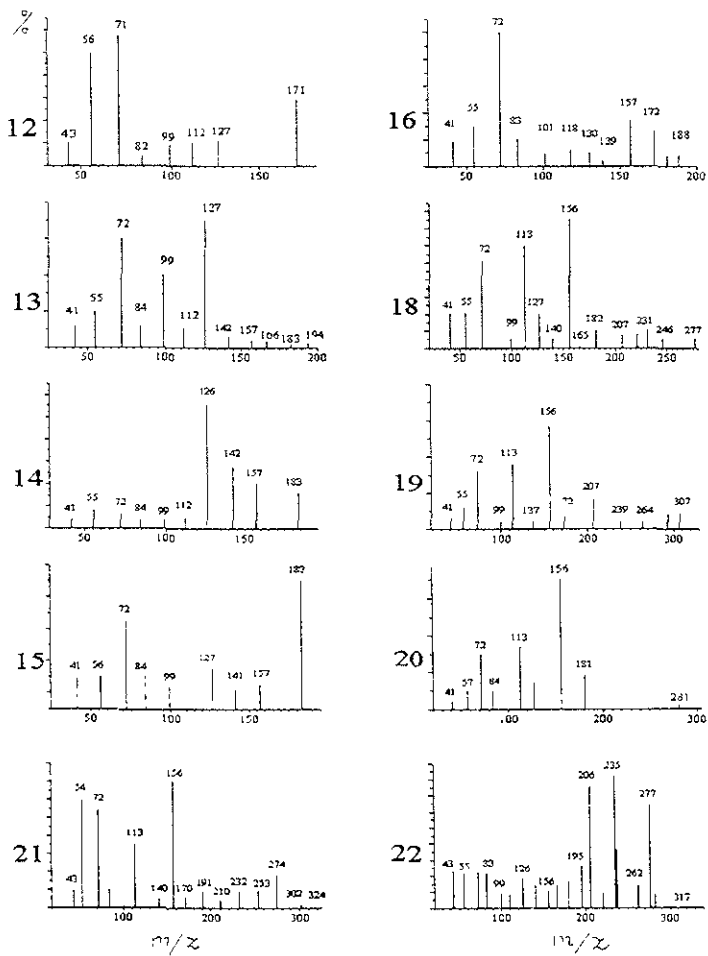


Fig. 7.4.4. Los espectros de masas de los productos de la pirólisis de leucina en presencia de silicagel.

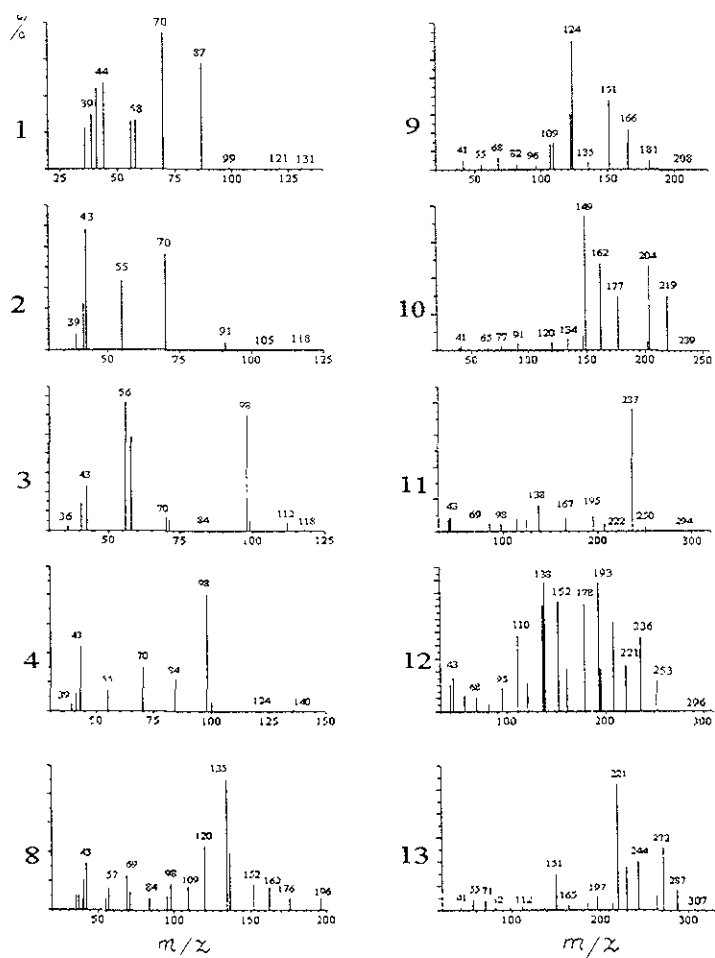


Fig. 7.4.4. (continuación)

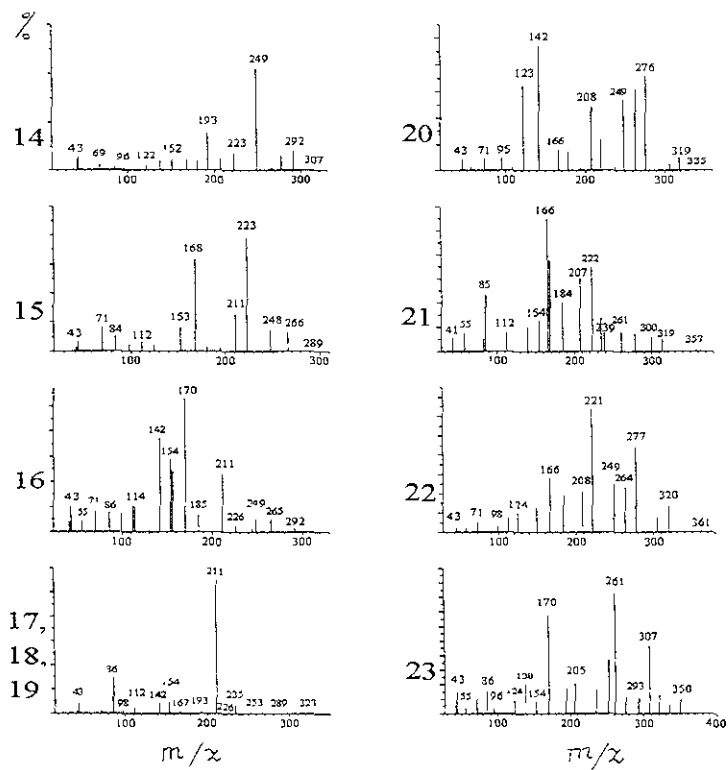
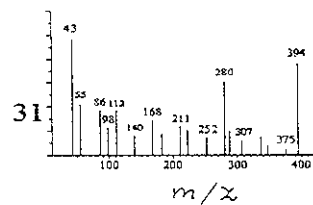
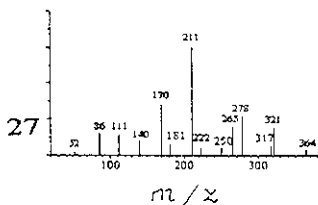
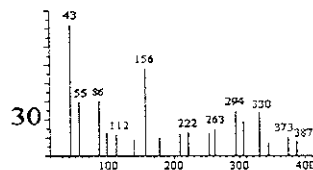
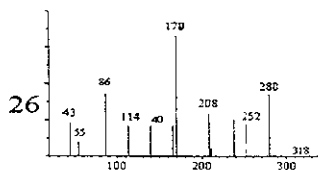
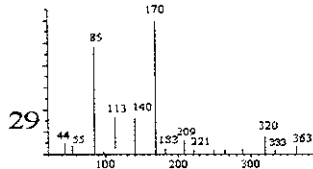
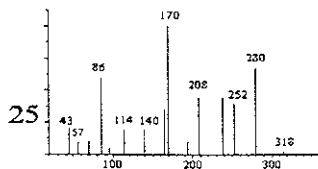
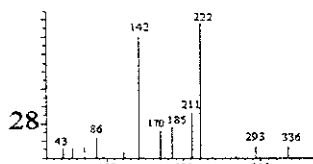
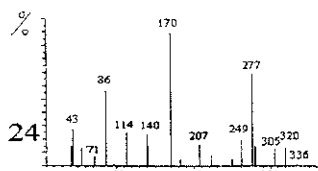


Fig. 7.4.4. (continuación)



7.5. Espectros de masas e infrarrojo de los compuestos formados por la pirólisis de poli-glicina, poli-alanina y poli-valina

Fig. 7.5.1. Los espectros de masas e infrarrojo de los productos de pirólisis de la poli-glicina

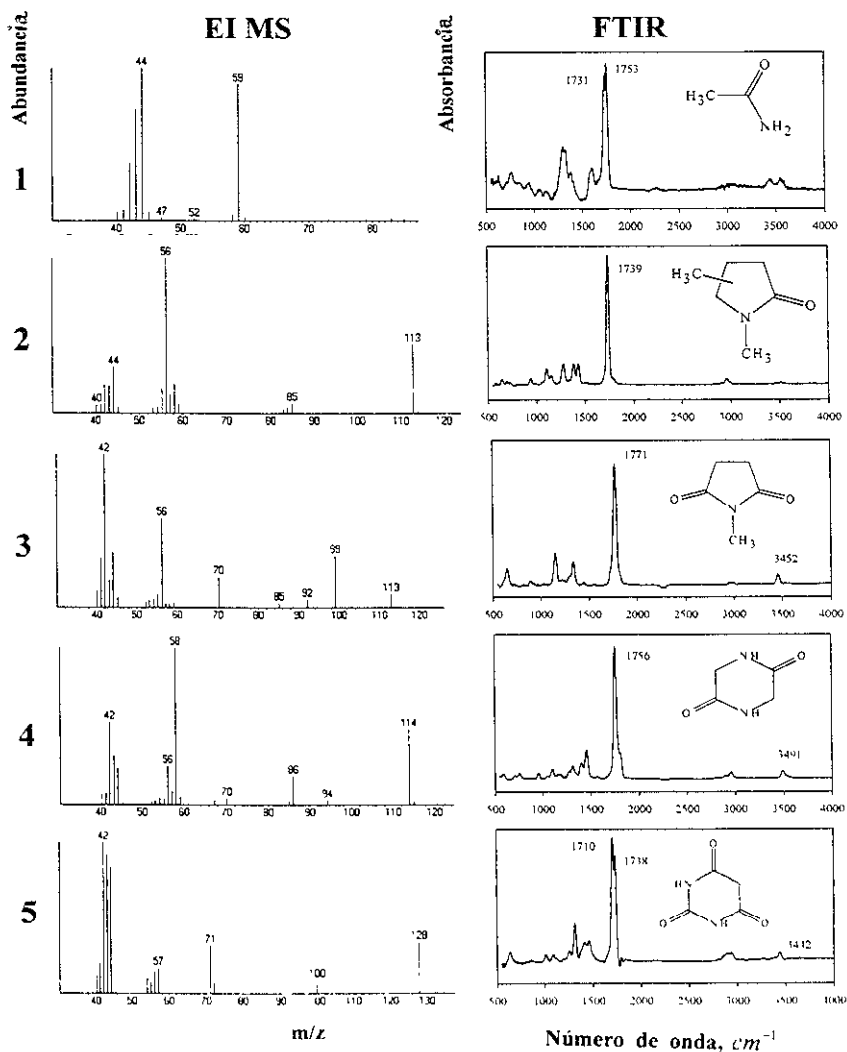


Fig. 7.5.2. Los espectros de masas e infrarrojo de los productos de pirólisis de la poli-alanina

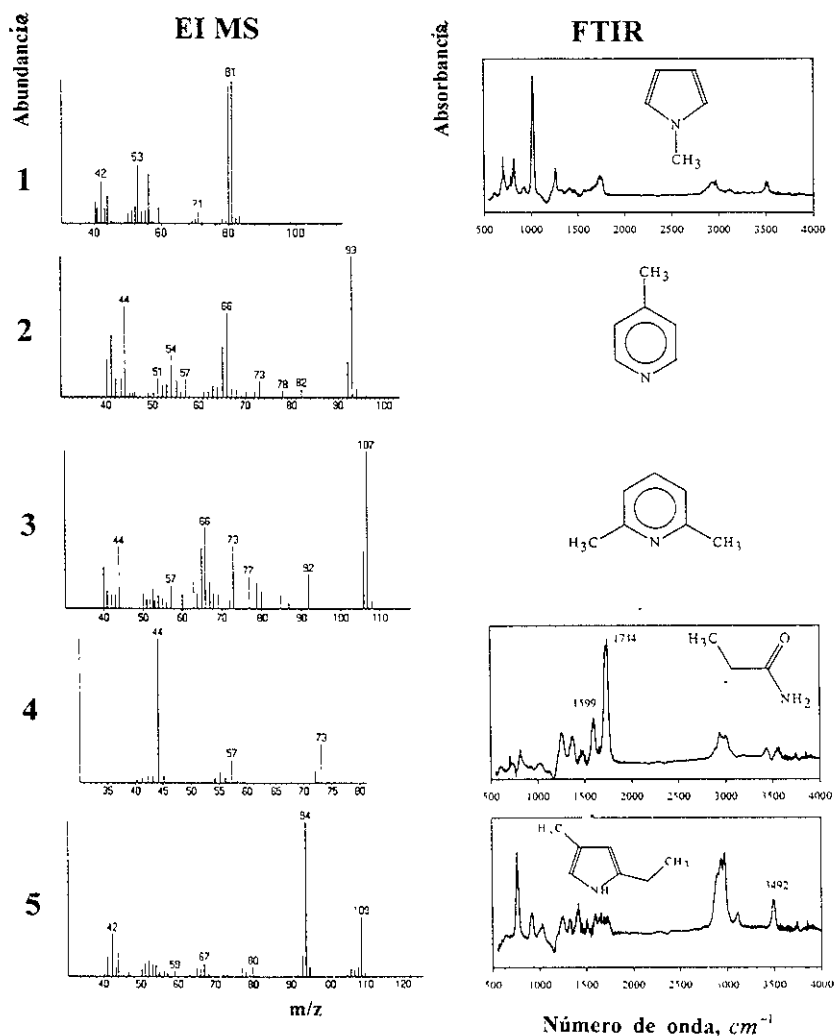


Fig. 7.5.2. (Continuación)

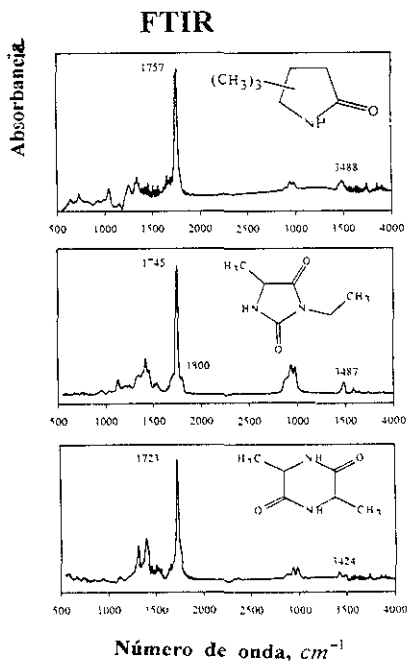
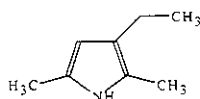
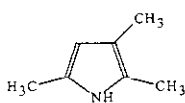
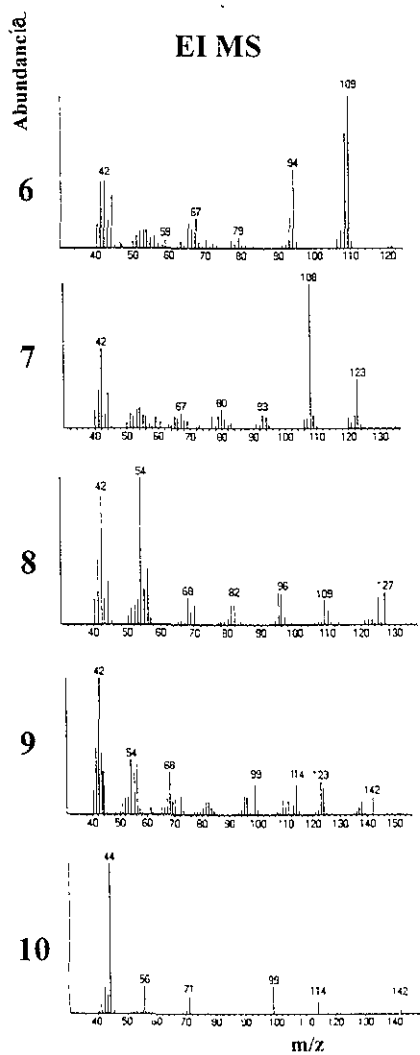


Fig. 7 5.3. Los espectros de masas e infrarrojo de los productos de pirólisis de la poli-valina

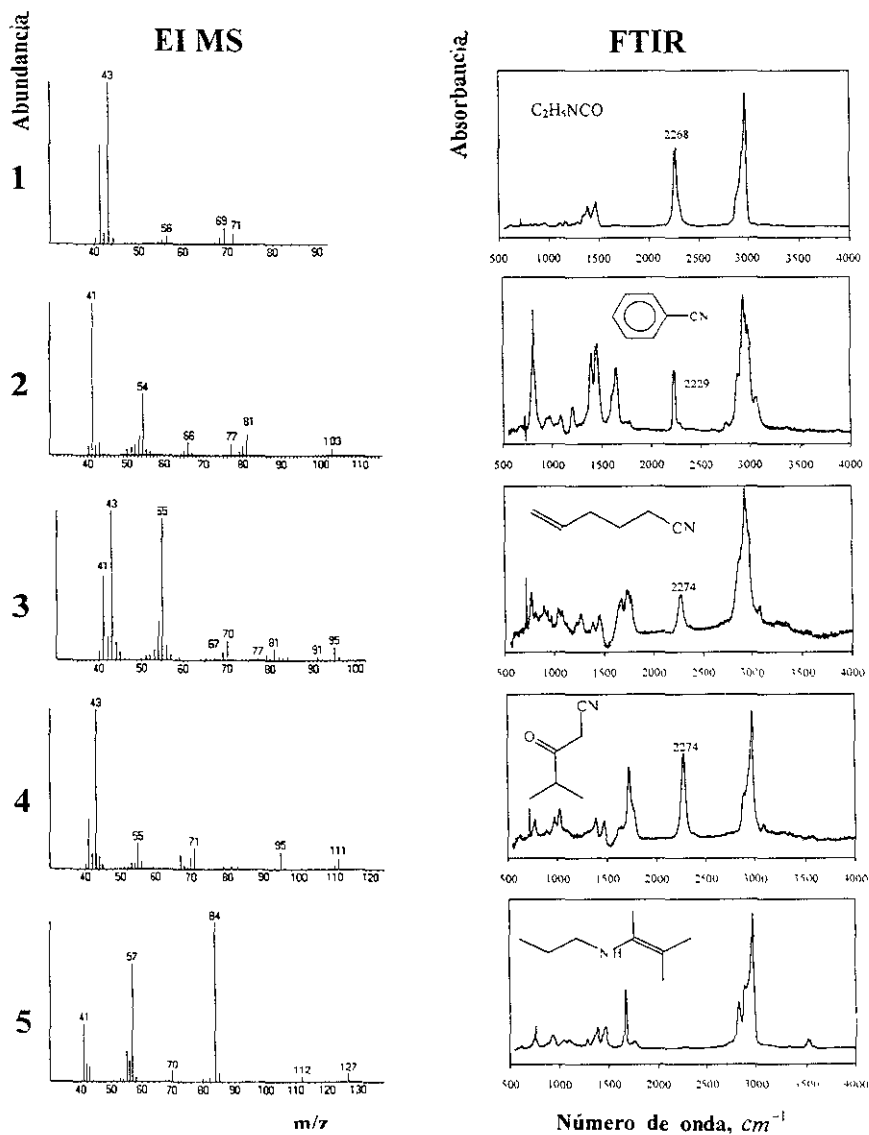


Fig. 7.5.3. (Continuación)

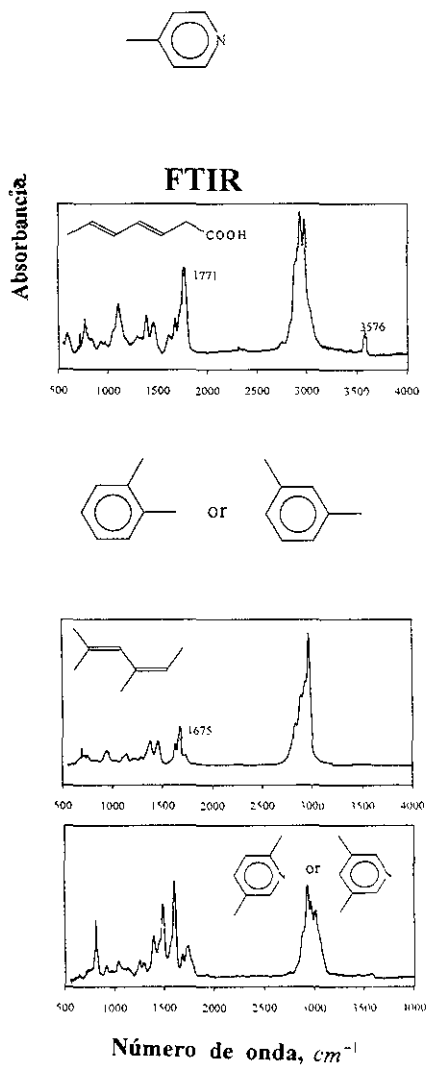
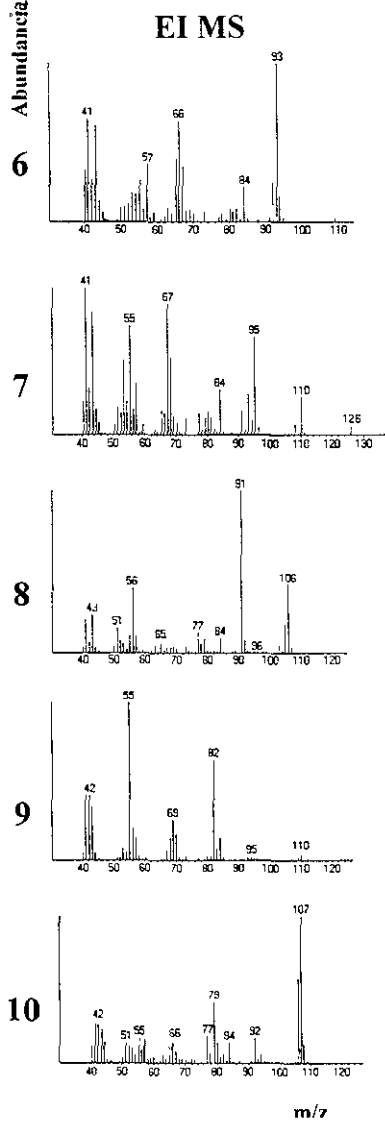


Fig. 7.5.3. (Continuación)

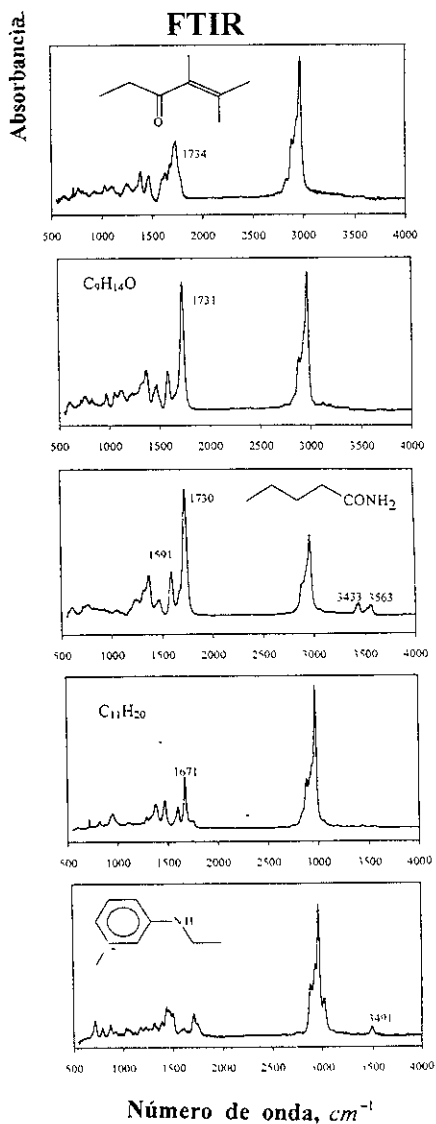
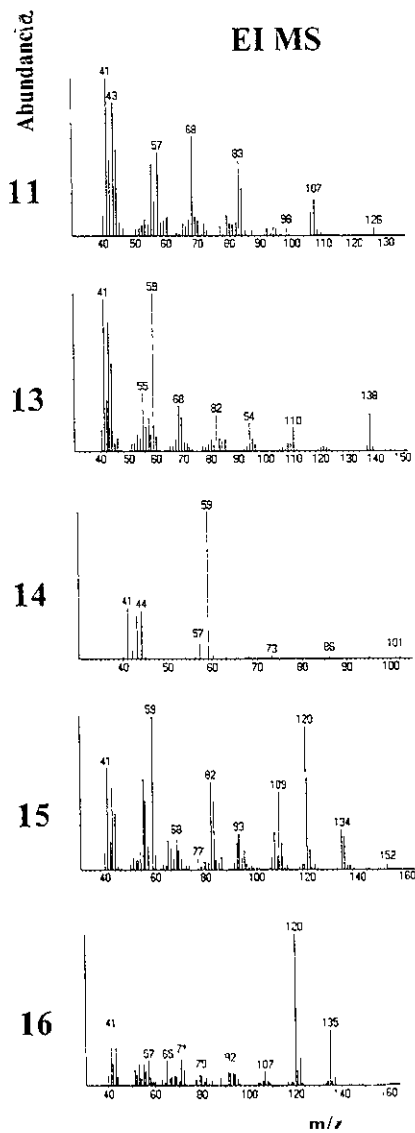
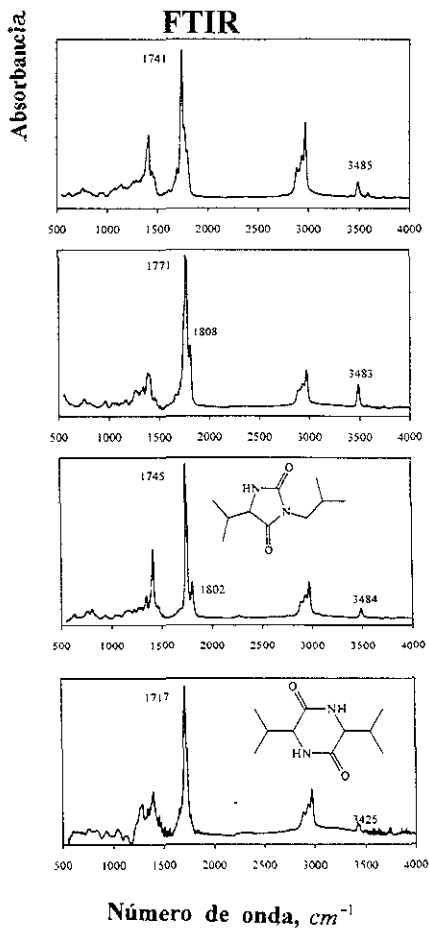
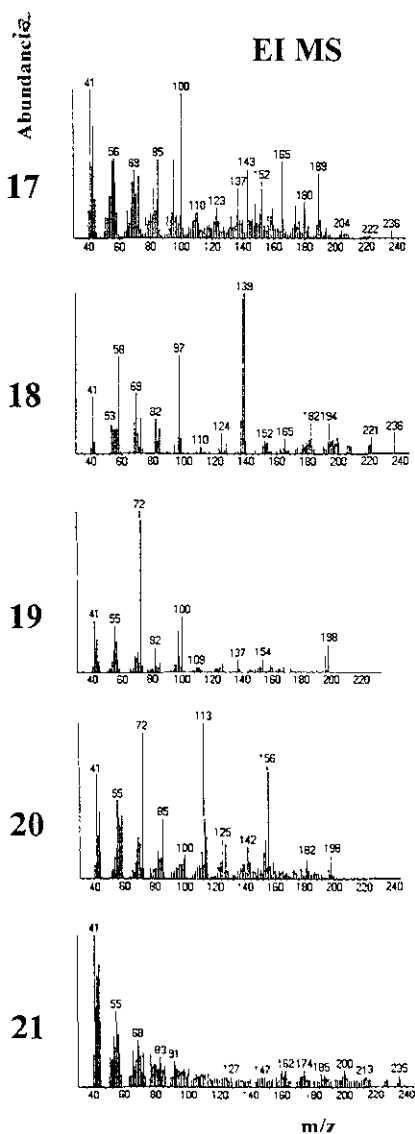


Fig 7.5.3. (Continuación)



8. REFERENCIAS

- Anders, E. (1989) Pre-biotic organic matter from comets and asteroids *Nature*, **342**, 255-257.
- Basiuk, V.A. (1992) Condensation of vaporous amino acids in the presence of silica. Formation of bi- and tricyclic amidines. *Origins Life Evol Biosphere*, **22**, 333-348.
- Basiuk, V.A. (1998), Pyrolysis of valine and leucine at 500°C: identification of less-volatile products using gas-chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy-mass spectrometry. *J Anal Appl Pyrol.* **47**, 127-143
- Basiuk, V.A. and Navarro-González, R. (1995) Dust in the Universe: Implications for terrestrial prebiotic chemistry. *Origins Life Evol Biosphere* **25**, 457-493.
- Basiuk, V.A. and Navarro-González, R (1997). Identification of hexahydroimidazo[1.2-a]pyrazine-3,6-diones and hexahydroimidazo[1.2-a]imidazo[1.2-d]pyrazine-3,8-diones, unusual products of silica-catalyzed amino acid thermal condensation and products of their thermal decomposition using coupled high-performance liquid chromatography--particle beam mass spectrometry and gas chromatography--Fourier transform infrared spectroscopy--mass spectrometry. *J Chromatogr.* **776**, 255-273.
- Basiuk, V.A and Navarro-González, R. (1998) Pyrolytic behavior of amino acids and nucleic acid bases: Implications for their survival during extraterrestrial delivery *Icarus*, **134**, 269-278.
- Basiuk, V.A , Gromovoy, T.Yu., Chuiko, A.A , Soloshonok, V.A. and Kukhar, V.P. (1992) A novel approach to the synthesis of symmetric optically active 2,5-dioxopiperazines. *Synthesis*, 449-451.
- Basiuk, V.A., Navarro-González R. and Basiuk, E V (1998a) Behavior of amino acids when volatilized in the presence of silica gel and pulverized basaltic lava. *Origins Life Evol Biosphere* **28**, 167-193.

Basiuk, V.A., Navarro-González R. and Basiuk, E.V. (1998b), Pyrolysis of alanine and α -aminoisobutyric acid: identification of less-volatile products using gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy/mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **45**, 89-102.

Basiuk, V.A., Navarro-González, R., Basiuk, E.V. (1998c) Hexahydroimidazo[1,2-a]pyrazine-3,6-dione and hexahydroimidazo[1,2-a]imidazo[1,2-d]pyrazine-3,8-dione, unusual dehydration products of amino acids. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **24**,747.

Basiuk, V.A., Van Meervelt, L., Soloshonok, V.A., Basiuk, E.V. (2000) 2,2,5,5,8,8-Hexamethyl-4,5,7,8-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyrazine-3,6-dione: A bicyclic product of α -aminoisobutyric acid condensation. *Acta Crystallogr.* **C56**, 598.

Ballistreri, A., Giuffrida, M., Maravigna, P., and Montaudo, G. (1985a) Direct Mass Spectrometry of Polymers. XII. Thermal fragmentation Processes in Poly- α -Aminoacids, *J. Polymer Sci. Polymer Chemistry Edition*, **23**,11145-1161.

Ballistreri, A., Giuffrida, M., Maravigna, P., and Montaudo, G. (1985b) Direct Mass Spectrometry of Polymers. XIII. Thermal fragmentation Processes in Copoly- α -Amino Acids *J. Polymer Sci. Polymer Chemistry Edition*, **23**, 1731-1747.

Boon, J.J., and Leeuw, J.W. (1987) Amino acid sequence information in proteins and complex proteinaceous material revealed by pyrolysis-capillary gas chromatography-low and high resolution mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **111**, 313-327

Bonner, W.A. (1991) The origin and amplification of biomolecular chirality. *Origins Life Evol. Biosphere* **21**, 59-111

Bradley, J.P., Brownlee, D.E. and Fraundorf, P. (1984) Discovery of nuclear tracks in interplanetary dust. *Science* **226**, 1432-1434.

Briggs, R., Ertem, G., Ferris, J.P., Greenberg, J.M., McCain, P.J., Mendoza-Gomez, C.X. and Schutte, W. (1992) Comet Halley as an aggregate of interstellar dust and further evidence for the photochemical formation of organics in the interstellar medium. *Origins Life Evol Biosphere* **22**, 287-307.

Chaves das Neves Higuinaldo J. and Morais, Z.B. (1997) HPLC Assay of Underivatized Free Amino Acids with Column Switching and Evaporative Light Scattering Detection, *J. High Resol Chromatogr.* **20**, 115-118.

Christoffersen, R. and Buseck, P.R. (1983) Epsilon carbide: A low-temperature component of interplanetary dust particles. *Science* **222**, 1327-1329.

Chyba, C.F. (1990) Extraterrestrial amino acids and terrestrial life. *Nature* **348**, 113-114.

Chyba, C.F. (1993) The violent environment of the origin of life Progress and uncertainties. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**, 3351-3358.

Chyba, C.F. and Sagan, C. (1992) Endogenous production, exogenous delivery, and impact-shock synthesis of organic molecules: An inventory for the origins of life *Nature* **355**, 125-132.

Chyba, C.F. and Sagan, C. (1997) Comets as a source of prebiotic organic molecules for the early Earth. In *Comets and the Origin and Evolution of Life*, ed. P.J. Thomas, C.F., Chyba, and C.P. McKay, pp.147-173. Springer, New York

Chyba, C.F., Thomas, P.J., Brookshaw, L. and Sagan, C. (1990) Cometary delivery of organic molecules to the Early Earth. *Science* **249**, 366-373.

Chyba, C.F., Owen, T.C. and Ip, W.-H. (1995) Impact delivery of volatiles and organic molecules to Earth. In *Hazards Due to Comets and Asteroids*, ed T Gehrels, pp. 9-58 Univ. of Arizona Press, Tucson.

- Cooper, G.W and Cronin, J.R. (1995) Linear and cyclic aliphatic carboxamides of the Murchison meteorite: Hydrolyzable derivatives of amino acids and other carboxylic acids. *Geochim. Cosmochim Acta* **59**, 1003-1015.
- Cronin, J.R. (1989) Origin of organic compounds in carbonaceous chondrites. *Adv. Space Res.* **9**, (2)59-(2)64.
- Cronin, J.R. and Moore, C.B. (1971) Amino acid analyses of the Murchison, Murray, and Allende carbonaceous chondrites. *Science* **172**, 1327-1329.
- Cronin, J.R. and Pizzarello, S. (1983) Amino acids in meteorites *Adv. Space Res.* **3**, 5-18.
- Cronin, J.R. and Pizzarello, S. (1997) Enantiomeric excesses in meteoritic amino acids. *Science* **275**, 951-955.
- Cronin, J.R., Gandy, W.E. and Pizzarello, S. (1980) Amino acids of the Murchison meteorite. In *Biogeochemistry of Amino Acids*, ed. P.E. Hare, p. 153. Wiley, New York.
- Danielson, N.D., Gljch, J.L. and Rogers, L.B.. (1978) Py-GC of Enzymes, *J Chromatogr Sci.*, **16**, 455-461.
- Danielson, N.D. and Rogers, L.B.. (1978) Determination of Tryptophan in Proteins by Py-GC. *Anal Chem* . **50**, 1680-1683.
- DeForest, P.R. and Kirk, P.L., (1973) Forensic Individualism of Hair, *Criminologist*. **8**, 35-45.
- Engel, M.H. and Macko, S.A. (1997) Isotopic evidence for extraterrestrial non-racemic amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **389**, 265-268

Esser, B.K. and Turekian, K.K. (1988) Accretion rate of extraterrestrial particles determined from osmium isotope systematics of Pacific pelagic clay and manganese nodules. *Geochim. Cosmochim. Acta* **52**, 1383-1388.

Fujimaki, M., Kato, S. and Kurata, T. (1969) Pyrolysis of Sulphurcontaining Amino Acids, *Agr Biol Chem.*, **33**, 1144-1151.

Greenberg, J.M. (1989) Synthesis of organic compounds in interstellar dust and their transport to Earth via comets. *Adv Space Res.* **9**, (6)15-(6)23.

Greenberg, J.M. and Hage, J.I. (1990) From interstellar dust to comets: A unification of observational constraints. *Astrophys. J.* **361**, 260-274.

Greenberg, J.M. and Li, A. (1996) From cosmic formation of chiral bioorganics in interstellar dust to comet seeds of life's origins: Are 10²⁵ chances enough? In *Chemical Evolution. Physics of the Origin and Evolution of Life*, eds. J. Chela-Flores and F. Raulin. p. 51. Kluwer, Dordrecht.

Greenberg, J.M. and Mendoza-Gómez, C.X. (1992) The seeding of life by comets. *Adv. Space Res.* **12**, (4) 169-180.

Greenberg, J.M. and Remo, J.L. (1997) Comets as porous aggregates of interstellar dust. In *Near-Earth Objects*, ed. J.L. Remo, pp. 96-117. The New York Academy of Sciences, New York.

Greenberg, J.M., Kouchi, A., de Groot, M., Hermsen, W., Niessen, W., Irth, H. and van Paradijs, J. (1994) Interstellar dust, chirality, comets and the origins of life: Life from dead stars? *J. Biol Phys* **20**, 61-70.

Gromovoy, T.Yu., Basiuk, V.A., and Chuiko, A.A. (1991) *Origins Life Evol Biosphere*, **21**, 119-128.

Gross, D. and Grodsky, G (1955) On the sublimation of amino acids and peptides. *J. Am. Chem. Soc* **77**, 1678-1680.

Hayes, J.M and Biemann, K. (1968) High-Resolution MS Investigations of the Organic Constituents of the Murray and Holbrook Chondrites, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **32**,239-267.

Hendricker, A.D., Voorhees, K.J.(1996) An investigation into the Curie-point pyrolysis-mass spectrometry of glycyl dipeptides, *J Anal Appl. Pyrol.*, **36**, 51-70

Higman, E.B., Schmeltz, I. and Schlotzhauer, W.S. (1969) Products from the Thermal Degradation of some Naturally Occurring Materials, *J Agric. Food Chem.*, **18**, 636-639.

Holland, H.D. (1984) *The Chemical Evolution of the Atmosphere and Oceans*. Princeton University Press, Princeton.

Hunten, D.M., Turco, R.P. and Toon, O.B. (1980) Smoke and dust particles of meteoric origin in the mesosphere and stratosphere *J Atmos Sci.* **37**, 1342-1357.

Irwin, W.J. (1982) *Analytical Pyrolysis A Comprehensive Guide* Marcel Dekker, New York. 3-25. 89-122, 334-339, 354-362.

Janak, J, (1960) Identification of Organic Substances by the GC Analysis of their Pyrolysis Products, in R.P.W. Scott (Ed.), *Gas Chromatography*, Butterworths, London, pp 387-400.

Jennings, Jr., E.C. and Dimick, K.P. (1962) GC of Pypolytic Products of Purines and Pyrimidines, *Anal Chem.*, **34**.1543-1547.

Jessberger, E.K , Christoforidis, A. and Kissel, J (1988) Aspects of the major element composition of Halley's dust *Nature* **332**, 691-695.

- Kasting, J.F. (1990) Bolide impacts and the oxidation state of carbon in the Earth's early atmosphere. *Origins Life Evol. Biosphere* **20**, 199-232.
- Kasting, J.F. (1993) Earth's early atmosphere *Science* **259**, 920-926.
- Kato, S., Kurata, T., Ishitsuka, R. and Fujimaki, M. (1970) Pyrolysis of β -Hydroxy Amino Acids, Especially L-Serine, *Agr Biol Chem.*, **34**, 1826-1832.
- Kiehl, J.T. and Dickinson, R.E. (1987) A study of the radiative effects of enhanced atmospheric CO₂ and CH₄ on early Earth surface temperatures. *J Geophys Res.* **92**, 2991-2998.
- Kissel, J. and Krueger, F.R. (1987) The organic component in dust from comet Halley as measured by the PUMA mass spectrometer on board Vega 1. *Nature* **326**, 755-760.
- Kobayashi, K., Kasamatsu, T., Kaneko, T., Koike, J., Oshima, T., Saito, T., Yamamoto, T. and Yanagawa, H. (1995) Formation of amino acid precursors in cometary ice environments by cosmic radiation. *Adv Space Res.* **16**(2), 21-26.
- Kojima, T., and Morishita, F., (1970) Application of Laser to Py-GC I. *J.Chromatogr Sci.*, **8**, 471-473.
- Kotra, R.K., Shimoyama, A., Ponnampereuma, C. and Hare, P.E. (1979) Amino acids in a carbonaceous chondrite from Antarctica. *J. Mol Evol.* **13**, 179-184.
- Kurat, G., Koeberl, C., Presper, T., Brändstatter, F. and Maurette, M (1994) Petrology and geochemistry of Antarctic micrometeorites. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 3879-3904.
- Kvenvolden, K., Lawless, J., Pering, K., Peterson, E., Flores, J., Ponnampereuma, C., Kaplan, I R and Moore, C. (1970) Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature* **228**, 923-926

- Kvenvolden, K.A., Lawless, J.G. and Ponnampereuma, C. (1971) Nonprotein amino acids in the Murchison meteorite. *Proc Natl Acad. Sci. USA* **68**, 486-490.
- Kyte, F.T. and Wasson, J.T. (1986) Accretion rate of extraterrestrial matter: Iridium deposited 33 to 67 million years ago *Science* **232**, 1225-1229
- Lawless, J.G., Kvenvolden, K.A., Peterson, E., Ponnampereuma, C. and Moore, C. (1971) Amino acids indigenous to the Murray meteorite *Science* **173**, 626-627
- Levsen, K. and Schuiten, H.-R., (1976) Analysis of Mixtures by CAMS: Pyrolysis Products of DNA, *Biomed. Mass Spectrom.*, **3**, 137-139.
- Lien, Y.C. and Nawar, W.W. (1974) Thermal Decomposition of Some Amino Acids. Valine, Leucine and Isoleucine, *J Food Sci*, **39**, 911-919.
- Love, S.G. and Brownlee, D.E. (1991) Heating and thermal transformations of micrometeoroids entering the Earth's atmosphere *Icarus* **89**, 26-43.
- Love, S.G. and Brownlee, D.E. (1993) A direct measurement of the terrestrial mass accretion rate of cosmic dust. *Science* **262**, 550-553.
- Mackinnon, I.D.R. and Rietmeijer, F.J.M. (1984) Bismuth in interplanetary dust. *Nature* **311**, 135-138
- Mackinnon, I.D.R. and Rietmeijer, F.J.M. (1987) Mineralogy of chondritic interplanetary dust particles. *Revs Geophys* **25**, 1527-1553.
- Mason, B. (Ed.) (1971) *Handbook of Elemental Abundances in Meteorites*. Gordon and Breach, New York.

- Mauger, A.B. (1971) Degradation of Peptides to Diketopiperazines: Application of Py-GC to Sequence Determination in Actinomycins, *Chem Commun.*, 163-168.
- Maurette, M. (1998) Carbonaceous micrometeorites and the origin of life *Origins Life Evol. Biosphere* **28**, 385-412.
- Maurette, M., Immel, G., Perreau, M., Pourchet, M., Vincent, C. and Kurat, G. (1992) The 1991 Euromet collection of micrometeorites at Cap-Prudhomme, Antarctica: discussion of possible collection biases. *Lunar Planet. Sci.* **23**, 859-860.
- Maurette, M., Brack, A., Kurat, G., Perreau, M. and Engrand, C. (1995) Were micrometeorites a source of prebiotic molecules on the early Earth? *Adv. Space Res.* **15**, (3)113-(3)126.
- McLafferty, F. W. and Turecek, F (1993) Interpretation of mass spectra, *University Science Book*, Sausalito, California, fourth edition.
- Merritt, Jr., C. and Robertson, D.H. (1967) The Analysis of Proteins, Peptides and Amino-Acids by Py-GC-MS, *J Gas Chromatogr.*, **5**,96-98.
- Merritt, Jr. C., DiPietro, C. and Robertson, D.H. (1974) Characterisation of Amino Acids by Py-GC-MS of their Phenylhydantoin Derivatives. *J. Chromatogr. Sci.* **12**,668-671.
- Meuzelaar, H.L.C., Kistemaker, P.G., Posthumus, M.A. and Kistemaker, J. (1973) Curie-point Pyrolysis in Direct Combination with Low Voltage EIMS New Method for the Analysis of Non-volatile Organic Compounds, *Anal. Chem.*, **45**, 1546-1549
- Meuzelaar, H.L.C, Kistemaker, P G. and Posthumus, M.A. (1974) Recent Advances in Py-MS of Complex Biological Molecules, *Biomed. Mass Spectrom* , **1**, 312-319.
- Meuzelaar, H.L.C, Haverkamp, J. and Hileman, F.D. (1982) *Pyrolysis Mass Spectrometry of Recent and Fossil Biomaterials* Elsevier, Amsterdam.

Munson, T.O. and Petterolf, D.D (1987) Evidence for the Formation of 2,4- Imidazolidinediones and Pyrrolidino[1,2a]-3,6-piperazinediones in Human Hair Pyrolyzate by Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J Anal Appl Pyrol*, **11**, 15-24.

Munson, T.O and Vick, J. (1985) Comparison of Human Hair by Pyrolysis-Capillary Column Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J Anal. Appl Pyrol.*, **8**, 493-501

Oberbeck, V.R., McKay, C P , Scattergood, T.W., Carle, G.C. and Valentin, J.R (1989) The role of cometary particle coalescence in chemical evolution. *Origins Life Evol. Biosphere* **19**, 39-55.

Oró, J. (1961) Comets and the formation of biochemical compounds on the primitive Earth. *Nature* **190**, 389-390.

Patterson, J.M., Haidar, N.F., Papadopoulos, E.P. and Smith, Jr W.T. (1973) Pyrolysis of Phenylalanine, 3,6-Dibenzyl-2,5-piperazinedione and Phenylethylamine, *J Org Chem*, **38**, 663-666.

Patterson, J.M., Haidar, N.F., Smith, Jr. W T , Benner, J F., Burtn. H.R. and Burdick, D. (1978) Benzo[a]pyrene Formation in the Pyrolysis of selected Amino Acids, Amines and Maleic Hydrazide. *J Agric Food Chem.* **17**, 268-270.

Peterson, E., Horz, F. and Chang, S. (1997) Modification of amino acids at shock pressures of 3.5 to 32 GPa. *Geochim Cosmochim Acta* **61**, 3937-3950.

Ponnamperuma, C (1972) Organic compounds in the Murchison meteorite *Ann New York Acad Sci*, **194**, 56-70

Posthumus, M A and Nibbering, N.M.M (1977) Py-MS of Methionine, *Org Mass Spectrom*, **12**, 334-337.

Posthumus, M.A., Boerboom, A.H.J. and Meuzelaar, H.L.C. (1974) Analysis of biopolymers by Curie-point Pyrolysis in Direct Combination with Low Voltage EIMS, *Adv Mass Spectrom.*, **6**, 397-402.

Posthumus, M.A., Nibbering, N.M.M., Boerboom, A.J.H. and Meuzelaar, H.L.C. (1974) Py-MS Studies on Nucleic Acids, *Biomed. Mass Spectrom.*, **1**, 352-357.

Ratcliff, M.A., Medley, E.E. and Simmonds, P.G. (1974) Pyrolysis of amino acids. Mechanistic considerations. *J. Org Chem.* **39**, 1481-1490.

Rietmeijer, F.J.M. and Mackinnon, I.D.R. (1985a) Poorly graphitized carbon as a new cosmo-thermometer for primitive extraterrestrial materials. *Nature* **315**, 733-736.

Rietmeijer, F.J.M. and Mackinnon, I.D.R. (1985b) Layer silicates in a chondritic porous interplanetary dust particle. *J Geophys. Res* **90**, suppl , D149-D155.

Rye, R., Kuo, P.H. and Holland, H.D. (1995) Atmospheric carbon dioxide concentrations before 2.2 billion years ago *Nature* **378**. 603-605.

Sagan, C. and Chyba, C. (1997) The early faint Sun paradox: organic shielding of ultraviolet-labile greenhouse gases. *Science* **276**. 1217-1221.

Sagan, C. and Mullen, G. (1972) Earth and Mars. Evolution of atmospheres and surface temperatures. *Science* **177**, 52-56.

Sears, D.W. (1975) Temperature gradients in meteorites produced by heating during atmospheric passage *Modern Geol.* **5**, 155-164.

Shimoyama, A., Ponnampuruma, C. and Yanai, K. (1979) Amino acids in the Yamato carbonaceous chondrite from Antarctica. *Nature* **282**, 394-396.

- Shulman, G.P. and Simmonds, P.G. (1968) Thermal Decomposition of Aromatic and Heteroaromatic Amino-Acids, *Chem Commun.*, 1040-1042.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. y Morrill, T.C. (1981) Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos, México.
- Simon, W. and Giacobbo, H. (1965) Thermische Fragmentierung und Strukturberbestimmung organischen Verbindungen, *Chem.-Ing Techn.*, **37**, 709-714.
- Simmonds, P.G., Medley, E.E., Ratcliff, Jr., M.A. and Shulman, G.P. (1972) Thermal Decomposition of Alifatic Monoamino Mono-Carboxylic Acids, *Anal Chem.* **44**, 2060-2066
- Simmonds, P.G., Shulman, G.P. and Stembridge, C.H. (1969) Organic Analysis by Py-GC-MS. A Candidate Experiment for the Biological Exploration of Mars, *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 36-41.
- Slack, J.A. (1977) *Some Applications of Py-GC-MS to the Identification of Drugs and Microorganisms*. Ph.D. Thesis. University of Aston in Birmingham
- Smith, G.G., Reddy, G.S. and Boon, J.J. (1988) Gas chromatographic—mass spectrometric analysis of the Curie-point pyrolysis products of some dipeptides and their diketopiperazines, *J. Chem. Soc Perkin Trans II*, 203-211.
- Stack, M.V. (1965) Py-GC of Amino Acids and Proteins. *Biochem J.* **96**, 56P
- Stack, M.V. (1967) Quantitative Resolution of Protein Pyrolysates by GC, *J. Gas Chromatogr.* **5**, 22-24.
- Stack, M.V. (1969) A Review of Py-GC of Biological Macromolecules, in C.L.A. Harbourn (Ed), *Gas Chromatography 1968*, Institute of Petroleum, London, pp. 109-118.
- Stack, M.V. (1979) Applications of GC in Dental Research, *J. Chromatogr.* **165**, 103-116.

- Steel, D. (1992) Cometary supply of terrestrial organics: Lessons from the K/T and the present epoch. *Origins Life Evol. Biosphere* **21**, 339-357.
- Stoker, C.R. and Bullock, M.A. (1997) Organic degradation under simulated Martian conditions *J Geophys. Res - Planets* **102**, 10881-10888
- Stoks, P. and Schwartz, A.W. (1979) Uracil in carbonaceous meteorites. *Nature* **282**, 709-710.
- Stoks, P. and Schwartz, A.W. (1981) Nitrogen-heterocyclic compounds in meteorites: Significance and mechanism of formation. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 563-569.
- Thomas, P.J. and Brookshaw, L. (1997) Numerical models of comet and asteroid impacts. In *Comets and the Origin and Evolution of Life*, edited by P.J. Thomas, C.F., Chyba, and C.P. McKay, pp. 131-146. Springer, New York.
- Ulehla, J. (1960) Py-GC of Amino Acids, *Zivocsna Vyroba*, **5**, 1-6.
- Van der Velden, W. and Schwartz, A.W. (1977) Search for purines and pyrimidines in the Murchison meteorite *Geochim. Cosmochim. Acta*, **41**, 961-968
- Vollmin, J., Kriemler, P., Omura, I., Seibl, J. and Simon, W. (1966) Structural Elucidation with a Thermal Fragmentacion-GC-MS Combinacion. *Microchem. J.*, **11**, 73-86
- Voorhees, K.J., Zhang, W., Hendricker, A.D., Murugaverl, B (1994) An investigation of the pyrolysis of oligopeptides by Curie-point pyrolysis-tandem mass-spectrometry. *J Anal Appl. Pyrol.*, **30**, 1-16.
- Walker, J.C G. (1986) Carbon dioxide on the early Earth. *Origins Life* **16**, 117-127.
- Wasson, J.T (1985) *Meteorites Their Record of Early Solar System History* Freeman, New York

Whittet, D.C.B. (1997) Is extraterrestrial organic matter relevant to the origin of life on Earth? *Origins Life Evol Biosphere* **27**, 249-262.

Yanson, I.D. and Teplitsky, A.B (1975) Heats of sublimation of crystals of organic compounds. *J. Phys Chem. USSR* **49**, 428-429.

Zahnle, K. and Grinspoon, D. (1990) Comet dust as a source of amino acids at the Cretaceous/Tertiary boundary. *Nature* **348**, 157-159

Zemany, P.D., (1952), Identification of Complex Organic Materials, *Anal Chem.*, **24**, 1709-1713.

Zolensky, M.E. and Mackinnon, I.D.R. (1985) Accurate stratospheric particle size distributions from a flat plate collection surface *J. Geophys Res.* **90**, 5801-5808.