



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LA DEPENDENCIA DEL PH EN LA
DESNATURALIZACIÓN DEL ADN INDUCIDA POR LUZ UVC:
UNA RUTA A LA REPLICACIÓN NO ENZIMÁTICA EN EL ORIGEN
DE LA VIDA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

P R E S E N T A :

LECHUGA JIMÉNEZ IVÁN

TUTOR

DR. KARO MICHAELIAN PAUW



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno
Lechuga
Jiménez
Iván
5540820237
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Física
109005108
2. Datos del tutor
Ph. D.
Karo
Michaelian
Pauw
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Pedro Eduardo
Miramontes
Vidal
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Octavio Reymundo
Miramontes
Vidal
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Adriana
Andraca
Gómez
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Iván
Santamaría
Holek
7. Datos del trabajo escrito
Análisis de la dependencia del
pH en la desnaturalización del
ADN inducida por luz UVC:
una ruta a la replicación no
enzimática en el origen de
la vida
35 p
2020

Dedicada a todas las personas que me han manifestado su amor.

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que me han ayudado a construirme como la persona que actualmente soy. En primer lugar, a mis padres, mi hermana, mis tíos, tías, primos, primas, abuelos, abuelas, amixs y compañerxs. A mi asesor por sus enseñanzas y por su guía en esta etapa de mi desarrollo profesional. A algunos de mis profesores y a las personas anónimas con las que me he topado a lo largo de mi vida. A la gente que trabaja y que lucha.

A la Dr. María del Rocío Cruz Ortega jefa del Laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología de la UNAM (IE-UNAM) por su amabilidad y apoyo para la fabricación de los reactivos necesarios para este trabajo.

Resumen

Uno de los problemas más difíciles concernientes al origen de la vida es la replicación del ADN al principio del Arcaico sin la existencia de enzimas complejas. Dentro del marco de la Teoría Termodinámica Disipativa del Origen de la Vida se plantea que existe la posibilidad de que la replicación del ADN fomentaba la disipación de fotones en el ultravioleta de longitud de onda larga (UVC 210-285 *nm*) y, por lo tanto, fue seleccionada termodinámicamente para promover la disipación de este potencial fotónico impuesto sobre la superficie de la Tierra durante el Arcaico. Para ello un mecanismo termodinámicamente viable tendría que acoplar la replicación con la disipación de estos fotones. Desde la perspectiva de ésta teoría se ha propuesto un mecanismo que hace tal acoplamiento denominado Replicación Asistida por Ultravioleta y Temperatura (UVTAR por sus siglas en inglés). El primer paso, que ya se ha demostrado experimentalmente, consiste en la desnaturalización del ADN inducida por luz UVC. Hay muchas propuestas de mecanismos microscópicos, derivados de la interacción de los fotones con la molécula, que pueden estar involucrados en su desnaturalización, algunos de ellos dependen del ambiente iónico del solvente en el que se encuentra la molécula. En esta tesis se realizaron los primeros intentos para identificar los mecanismos de éste tipo involucrados al variar el pH del solvente. Se usó espectrofotometría en el UV para su estudio. A pesar de que el experimento no fue suficiente para determinarlos se encontró que la desnaturalización inducida por luz UVC del ADN se ve promovida en soluciones ligeramente ácidas. Este resultado es interesante porque es casi universalmente considerado que los mares eran ligeramente ácidos durante el arcaico. Se concluyó que los mecanismos que requieran de la deprotonación de las bases del ADN probablemente no estén involucrados, mientras que aquellos que requieran de la transferencia de protones entre las bases probablemente sí lo estén. Por último, gracias a este trabajo, se identificaron muchos detalles útiles para modificar el diseño del experimento que permitirán su perfeccionamiento con el objetivo de obtener datos suficientemente robustos como para poder presentarlos en una revista especializada.

Abstract

One of the most difficult problems regarding the origin of life is DNA replication at the beginning of the Archaic without the existence of complex enzyme. Within the framework of the Thermodynamic Dissipation Theory of the Origin of Life, it is proposed that there is a possibility that DNA replication promoted the dissipation of photons in the long-wavelength UVC region (210-285 *nm*) and, therefore, was thermodynamically selected to promote the dissipation of this photonic potential imposed on the surface of the Earth during the Archean. For this, a viable non-enzymatic thermodynamic mechanism for denaturing would have to couple the replication with the dissipation of these photons. From the perspective of this theory, a mechanism has been proposed that makes such a coupling, called Ultraviolet and Temperature Assisted Replication (UVTAR). The first step in this mechanism is the UVC-induced denaturing of DNA which has already been demonstrated experimentally. A number of microscopic mechanisms have been proposed for the denaturing involving the interaction of the photon with DNA, some of them depend on the solvent ionic environment where the molecule is found. In this thesis the first attempts were made to identify the mechanisms involved in UVC-induced denaturing of DNA by varying the pH of the solvent. UV spectrophotometry was used for this study. Although the experiment was not enough to determine them, we found that UVC light-induced denaturation of DNA is promoted in slightly acidic solutions. This is interesting since it is almost universally accepted that the Archean ocean surface was somewhat acidic. We concluded that the mechanisms that require deprotonation of the DNA bases are probably not involved, while those that require the proton transfer between the bases are the most likely to be involved. Finally, thanks to this work, many useful details were identified to modify the design of the experiment, that will allow its improvement with the objective of obtaining sufficiently robust data to be able to present them in a specialized magazine.

Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	V
1. Introducción.	1
1.1. Relevancia de la termodinámica disipativa en el origen y evolución de la vida.	1
1.2. Termodinámica de procesos irreversibles o de no equilibrio.	3
1.2.1. Entropía.	4
1.2.2. Estados estacionarios fuera del equilibrio.	6
1.2.3. Sistemas no lineales.	8
1.2.4. Estructuras disipativas.	10
1.3. Antecedentes.	11
1.3.1. Replicación Asistida por Ultravioleta y Temperatura: UVTAR.	11
1.3.2. Desnaturalización del ADN inducida por luz ultravioleta (UVTAR).	12
1.3.3. Desnaturalización del ADN debida a la foto-deprotonación de sus bases.	13
1.3.4. Desnaturalización del ADN debida a la foto-transferencia de protones.	14
2. Método.	15
2.1. Descripción del experimento.	15
2.2. Elaboración de volúmenes de Dulbecco's PBS con diferentes valores de pH.	16
3. Resultados y discusión.	17
3.1. Concentración del ADN en las diferentes soluciones.	17
3.2. Extinción de luz UVC.	19
3.3. Espectro de diferencia inducido por UV.	27
4. Discusión y Conclusiones.	31
4.1. Con respecto al diseño del experimento.	31
4.2. Con respecto a los resultados.	31
4.3. Implicaciones para la Teoría Disipativa del Origen de la Vida.	32

Índice de figuras

3.1.	Ajuste lineal entre la extinción máxima y la concentración obtenida para cada muestra.	18
3.2.	En la gráfica de la izquierda se muestra el espectro de extinción al comienzo del primer periodo de luz incidente de todas las muestras antes del primer ajuste en la concentración, mientras que la del lado derecho, muestra el resultado después del ajuste.	19
3.3.	Extinción como función del tiempo, ciclando la luz en una hora incidiendo sobre la muestra y una hora bloqueada, promediada en 15 regiones de longitud de onda de la muestra de ADN con pH de 6.43 y 60 °C. Cada color identifica una región de longitud de onda, en este caso la región en rosa es la de mayor extinción y corresponde a 250-266 nm.	19
3.4.	Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo. Sólo hay registro de datos durante los periodos de luz incidiendo en la muestra (línea morada). El espacio en blanco corresponde al periodo de la luz siendo bloqueada. En el primer periodo de luz incidente hay un aumento en la extinción a lo largo del tiempo pero en el segundo periodo hay aumentos y descensos.	20
3.5.	Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo. La gráfica (pH 6.66) muestra un aumento visualmente constante en la tasa de desnaturalización en ambos periodos de luz encendida y una disminución en la extinción durante el periodo de luz bloqueada.	21
3.6.	Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo. La gráfica corresponde a la muestra con pH de 7.06, muestra una disminución en la tasa de desnaturalización en el primer periodo de luz encendida y un comportamiento no creciente en el segundo.	22
3.7.	Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.28. La gráfica muestra un comportamiento que no es congruente con lo reportado en [11].	22
3.8.	Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.28 utilizando los datos del experimento reportado en [11].	23
3.9.	Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.60. La gráfica muestra una tasa de desnaturalización visualmente constante en el primer periodo de luz incidente, una disminución notable en la extinción durante el periodo de luz bloqueada y una tasa nula de desnaturalización durante el segundo periodo de luz incidente.	24
3.10.	Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.90. La gráfica muestra que la extinción se mantiene constante tanto en los periodos de luz encendida como en el de luz bloqueada.	24
3.11.	Extinción en función del tiempo durante el proceso de desnaturalización total al comienzo del experimento correspondiente a la solución con pH de 7.06.	25
3.12.	Extinción en función del tiempo durante el proceso de desnaturalización total al comienzo del experimento correspondiente a la solución con pH de 7.28.	26
3.13.	Extinción en función del tiempo durante el proceso de desnaturalización total al comienzo del experimento correspondiente a la solución con pH de 7.90.	26

<p>3.14. Espectros de extinción tomados el final de cada periodo de luz encendida y apagada de la muestra con pH 6.43. La gráfica de la derecha muestra el espectro completo y la de la izquierda el detalle de la región de 240-280 nm.</p>	<p>27</p>
<p>3.15. Espectros de diferencia de las soluciones analizadas. La línea continua es espectro de diferencia obtenido en el primer periodo de luz incidente mientras que la línea punteada es el espectro de diferencia del periodo de luz bloqueada. Ambos espectros se muestran del mismo color para cada solución. Los espectros se muestran normalizados respecto a la concentración y a la temperatura de derretimiento del ADN en función del pH.</p>	<p>28</p>
<p>3.16. Espectros de diferencia de las soluciones analizadas normalizadas con la concentración medida con lo extinción máxima de cada solución a 85°C. La línea continua es el espectro de diferencia obtenido en el primer periodo de luz incidente mientras que la línea punteada es el espectro de diferencia del periodo de luz bloqueada. Ambos espectros se muestran del mismo color para cada solución.</p>	<p>29</p>

Capítulo 1

Introducción.

1.1. Relevancia de la termodinámica disipativa en el origen y evolución de la vida.

La Teoría Termodinámica Disipativa del Origen y Evolución de la Vida [1–3] tiene una base fundamental en el concepto de estructura disipativa desarrollado por Ilya Prigogine [12]. Al someter a un sistema a un potencial generalizado externo éste evolucionará a través de una dinámica interna (estructura disipadora) de tal manera que se autoorganiza para aumentar la capacidad de disipación del potencial externo con la concomitante producción de entropía, uno de los pilares más importantes de ésta teoría es que la vida en sus comienzos puede entenderse como una micro estructura disipativa que emergió para disipar el potencial fotónico prevalente sobre la superficie de la Tierra en el Arcaico, que llevó a la formación de las primeras biomoléculas y sus estructuras de soporte y su posterior evolución y aumento de complejidad que ha derivado en la biosfera actual, ésta perspectiva da bases para estudiar el origen de la vida con fundamentos físicos y químicos. Una de las teorías más difundidas sobre el origen de la vida, que se fundamenta en principios de ese tipo, es la del bioquímico soviético Aleksandr Ivanovich Oparin que considera que los componentes de la atmósfera en el Arcaico (principalmente vapor de agua, dióxido de carbono, metano y amoníaco) reaccionaban entre ellos bajo la acción de descargas eléctricas y de la luz ultravioleta para formar biomoléculas, por ejemplo, algunos aminoácidos. Biológicamente la propuesta de Oparin no deja claro cómo éste proceso pudo derivar en algún mecanismo de evolución como la selección natural y, física y químicamente, no es claro cómo aumentan de complejidad las biomoléculas. La perspectiva disipativa de ésta propuesta da soluciones a las problemáticas mencionadas y otras más. Antes de desarrollar los elementos teóricos de la termodinámica que la envuelven es importante aproximarse a algunas discusiones concernientes al origen y evolución de la vida que son pertinentes para la perspectiva disipativa.

La discusión que se ha realizado [1–3] sobre las ideas y teorías modernas sobre el origen y la evolución de la vida sugiere que los procesos biológicos relacionados con la aparición de las primeras moléculas esenciales para la vida, junto con su proliferación, han sido dirigidos por factores físicos y químicos externos, se caracterizan por el acoplamiento de muchos otros procesos, no necesariamente biológicos, y, además, son capaces de autoorganizarse. La teoría de Gaia, propuesta por James Lovelock, ha estudiado las fuertes y complejas interacciones que se mantienen entre los seres vivos y su medio ambiente, ésta perspectiva llevó a la idea de que la Tierra es en sí un organismo vivo capaz de autoregular sus propiedades físicas tales como temperatura, salinidad de los océanos, contenido de oxígeno en la atmósfera y demás, todo con la intención de mantener las condiciones necesarias para la proliferación de la vida. Desde la perspectiva termodinámica disipativa la biosfera actúa como una gran estructura disipativa que acopla una gran cantidad de procesos biológicos y no biológicos, como el ciclo del agua y el ciclo del carbono, bajo el imperativo de aumentar la disipación del potencial fotónico prevalente sobre la superficie terrestre.

Otra teoría pertinente a la perspectiva disipativa del origen de la vida es la teoría autocatalítica propuesta por Stuart Kaufmann. Se basa en que las reacciones químicas autocatalíticas debieron ser esenciales para el origen de la vida debido a la ampliación exponencial que proveen que, justamente, es una de las características de la vida. Una de las reacciones de este tipo más conocidas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), es una técnica que se utiliza para replicar a gran escala un fragmento de ADN. Una de las propuestas de ésta teoría es que el carácter biológico de las primeras biomoléculas pudo haberse heredado del comportamiento de las reacciones autocatalíticas.

Sin embargo, tanto la teoría de Gaia como la autocatalítica no muestran un sustento en la disipación de algún potencial generalizado, de acuerdo con [1] esto es clave para que la teoría autocatalítica no tuviera sustento empírico que la validara, en realidad, si en una reacción autocatalítica no se considera la presencia de algún potencial generalizado externo que otorgue la energía necesaria para realizar el trabajo entonces no es compatible con la segunda ley de la termodinámica, es decir, es equivalente a una máquina de movimiento perpetuo.

La visión termodinámica de procesos irreversibles, a través de las estructuras disipadoras, da una importante pista acerca del origen de la vida y da soluciones a las problemáticas planteadas hasta este momento. Puesto que el potencial fotónico otorgado por el Sol es el potencial externo de mayor disponibilidad sobre la Tierra resulta natural pensar que los procesos biológicos se originaron, proliferaron, evolucionaron y siguen evolucionando bajo el imperativo termodinámico de disiparlo, la energía transmitida por los fotones en el Arcaico se empleó para poder realizar una serie de reacciones fotoquímicas autocatalíticas que derivaron en la aparición de las primeras biomoléculas, estos procesos aumentaron su complejidad y se han acoplado para formar la biosfera actual. Hay investigaciones [1–10] que muestran que el ADN y otras moléculas esenciales para la vida son pigmentos en el ultravioleta de longitud de onda larga (UVC 210–285nm) que actuaron como micro-estructuras disipadoras del potencial fotónico prevalente durante el Arcaico.

Otro de los procesos biológicos cuyo origen sigue siendo un gran problema, tanto para teorías biológicas como físicas y químicas, es el de la replicación sin enzimas del ADN. Por un lado, ésta molécula necesita de un agente catalizador para replicarse, es decir, formar nuevas cadenas idénticas a partir de una original, por el otro, dentro de la información que almacena incluye aquella necesaria para la síntesis de éste agente catalizador. Ésta situación lleva a un dilema similar al ¿qué fue primero, el huevo o la gallina? Si el ADN apareció antes que el agente enzimático ¿cómo puede replicarse en ausencia del agente catalizador? y si el agente catalizador apareció primero ¿cómo pudo sintetizarse sin la información necesaria? La perspectiva disipativa propone un mecanismo termodinámicamente viable y congruente con las condiciones físicas y químicas que se estiman existían en la superficie de la Tierra durante el Arcaico, mediante el cual el ADN se pudo haber replicado en ausencia de enzimas, tal mecanismo se conoce como Replicación Asistida por Ultravioleta y Temperatura (UVTAR por sus siglas en inglés).

Resultados publicados en fechas recientes [11] han mostrado que la luz UVC induce la desnaturalización reversible del ADN y, además, es comparable con aquella que es inducida térmicamente (las técnicas de laboratorio más comunes para desnaturalizar ADN son de éste tipo, por ejemplo, la PCR). Este es tan solo el primer paso en la determinación de una ruta hacia la replicación en ausencia de enzimas del ADN durante el Arcaico. Uno de los posibles siguientes pasos dentro de esta línea de investigación es estudiar los efectos del pH en la desnaturalización de ésta molécula y su relación con los mecanismos microscópicos que la inducen y que dependen del ambiente iónico que la rodea, ésta tesis es el comienzo en ésta línea de investigación. Para comenzar la discusión de esta investigación es necesario desarrollar algunos de los fundamentos de la termodinámica fuera de equilibrio que son esenciales para la Teoría termodinámica disipativa del origen y evolución de la vida [1–3]. Posteriormente se discutirán los antecedentes inmediatos a partir de los cuales se diseñó el experimento expuesto en esta tesis, es decir, un escenario de tipo UVTAR, las condiciones físicas y químicas de la superficie de la Tierra en el Arcaico y los posibles mecanismos de desnaturalización

inducida por UVC dependientes del pH del ambiente que envuelve al ADN. Después se mostrarán las mediciones realizadas que son de tres tipos, aquellas relacionadas con la concentración de las muestras, las que miden la extinción en función del tiempo y los espectros de diferencia. Por último, se muestran las conclusiones derivadas directamente de los resultados, las que buscan mejorar el diseño y proceso experimental y aquellas relacionadas con la Teoría disipativa del origen y evolución de la vida.

1.2. Termodinámica de procesos irreversibles o de no equilibrio.

La termodinámica clásica tiene un fundamento teórico muy fuerte en los llamados estados de equilibrio. Los procesos estudiados por esta área consisten en sucesiones cuasiestáticas de dichos estados, sin embargo, los estados de equilibrio no son fáciles de encontrar o crear a menos que se produzcan bajo condiciones muy excepcionales. Por otro lado, todos los fenómenos observados en la naturaleza se caracterizan, en sentido estricto, por desenvolverse fuera del estado de equilibrio aunque en muchos casos el estado de equilibrio es una buena aproximación. La termodinámica fuera de equilibrio se concentra en estudiar a los procesos termodinámicos que se alejan del estado de equilibrio y que se conocen como procesos irreversibles. El desarrollo de esta sección está basado en la discusión de Prigogine [12] salvo que se indique lo contrario.

La termodinámica clásica se centra en estudiar sistemas aislados, aquellos que no pueden intercambiar energía ni materia con sus alrededores, el primer paso para el desarrollo de la termodinámica de procesos irreversibles sugiere ampliar las técnicas conocidas para los sistemas cerrados a los sistemas abiertos que sí permiten el intercambio de materia y energía. Para ello se considera el principio de conservación de la masa en este tipo de sistema, haciendo una diferenciación entre las variaciones de la masa debida a procesos internos $d_i m$ y la variación externa atribuida a la interacción con los alrededores del sistema $d_e m$, obteniendo la relación:

$$dm = d_e m + d_i m. \quad (1.1)$$

Se estudiarán ahora la conservación de la masa en sistemas cerrados. Consideremos un sistema que consiste en una cantidad finita de componentes en el cual se lleva a cabo una reacción química simple. El cambio de la masa de una componente γ se escribe en términos de su masa molar M_γ , su coeficiente estequiométrico ν_γ y la extensión de reacción ξ (definida como el cambio en el número de moles de un componente por el coeficiente estequiométrico de la reacción $d\xi = \frac{dn_\gamma}{\nu_\gamma}$), de la siguiente manera:

$$dm_\gamma = \nu_\gamma M_\gamma d\xi \quad (1.2)$$

Considerando un sistema cerrado el cambio total de la masa será la suma del cambio de masa de cada una de las componentes y, además, será nulo:

$$dm = \left(\sum_\gamma \nu_\gamma M_\gamma \right) d\xi = 0 \quad (1.3)$$

lo que nos lleva a la ecuación estequiométrica:

$$\sum_\gamma \nu_\gamma M_\gamma = 0 \quad (1.4)$$

Retomando la discusión en sistemas abiertos, al considerar el número de moles n_γ , la ecuación (1.1) obtiene la forma:

$$dn_\gamma = d_e n_\gamma + \nu_\gamma d\xi \quad (1.5)$$

sumando sobre todas las componentes y considerando la ecuación (1.4) se obtiene que:

$$dm = d_e m \quad (1.6)$$

Es decir, en un sistema abierto el cambio de masa sólo puede ser debido a las interacciones con el exterior.

Este resumido proceso ilustrado por las ecuaciones (1.1) y (1.6) otorgan una pista que será crucial para el estudio de la termodinámica de lo irreversible. La capacidad de distinguir entre cambios de una magnitud del sistema debidos a procesos internos y a procesos externos será explotada por Prigogine para la formulación de leyes análogas a las de la termodinámica clásica. En el caso de la primera ley se tiene que la energía interna del sistema E es una función de estado cuya variación será igual a la energía intercambiada con los alrededores del sistema, es decir, $dE = d_e E$ de manera que $d_i E = 0$. En el caso de sistemas abiertos habrá que considerar el flujo energético debido al intercambio de masa:

$$dE = d\phi + dW \quad (1.7)$$

donde $d\phi$ es el flujo de energía debido al intercambio de calor y energía transportada por la materia y dW es el intercambio de trabajo mecánico con los alrededores.

Desde la perspectiva de la teoría disipativa del origen y evolución de la vida la segunda ley de la termodinámica o el principio de entropía y la producción de entropía tienen relevancia fundamental. Las siguientes subsecciones están enfocadas a desarrollar con más detalle este principio y a conceptos y desarrollos consecuentes que son fundamentales para la teoría propuesta.

1.2.1. Entropía.

Es posible hacer una formulación basada en un principio maximal de la termodinámica del equilibrio. Callen [15] otorga una serie de postulados que permiten solucionar de manera formal el problema básico de la termodinámica: hallar los valores en el equilibrio de los parámetros del sistema (U, V, N_α). Los postulados se muestran a continuación [15]:

1. "Existe una función (denominada entropía S) de los parámetros extensivos ¹ de cualquier sistema compuesto, definida para todos los estados de equilibrio y que tiene la propiedad siguiente: los valores que toman los parámetros extensivos, en ausencia de ligaduras internas, son aquellos que maximizan la entropía respecto al conjunto de los estados de equilibrio ligados".
2. "La entropía de un sistema compuesto es aditiva respecto a la de los subsistemas constituyentes. La entropía es continua y diferenciable, y es una función monótonamente creciente de la energía".
3. "La entropía se anula en el cero de temperatura".

Estos postulados permiten concluir que la entropía tiene la siguiente propiedad:

- (a) La entropía nunca decrete, su cambio es cero cuando el sistema evoluciona mediante un proceso reversible y aumenta si evoluciona mediante uno irreversible.

El postulado de la entropía en la termodinámica de procesos irreversibles establece que existe una función de estado, llamada entropía que tiene las siguientes propiedades:

1. La entropía del sistema es una propiedad extensiva.
2. El cambio de entropía dS puede separarse en dos partes: $d_e S$ que corresponde al flujo de entropía debido a las interacciones con el exterior y $d_i S$ debido a los procesos internos irreversibles. Es decir:

¹Un parámetro extensivo es aquel cuyo valor es igual a la suma de él mismo en cada uno de sus subsistemas [15].

$$dS = d_e S + d_i S \quad (1.8)$$

Además, $d_i S$ satisface la propiedad (a).

Para un sistema aislado no hay flujo de energía con el exterior, por lo que:

$$dS = d_i S \geq 0 \quad (1.9)$$

Consideremos un sistema 1 encerrado en un sistema 2, de tal manera que el sistema completo 1+2 esté aislado y, además, en cada sistema se lleva a cabo algún proceso irreversible. Del postulado clásico de la entropía se tiene que $dS = dS^1 + dS^2 \geq 0$. Del nuevo postulado de la entropía se desprende que $d_i S^1 \geq 0$ y $d_i S^2 \geq 0$ por lo que una situación tal como $d_i S^1 > 0$, $d_i S^2 < 0$ y $d(S^1 + S^2) > 0$ esta prohibida, ya que $d_i S^2$ nunca es negativa. Tal situación puede ocurrir cuando dos procesos irreversibles se interfieren en la misma región del sistema, en el caso aquí mostrado esto es cuando la frontera del sistema 1 coincide con la del sistema 2. Dicho de otra forma, la disminución de entropía en alguna región del sistema compensada por su aumento en otra región de tal forma que el cambio en la entropía total del sistema sea positiva no es posible, a menos que ambos procesos se lleven a cabo en la misma región. Se tiene entonces que, en cada región macroscópica del sistema la producción total de entropía debe ser positiva, y se postula entonces que, en cada región "pequeña pero lo suficientemente grande (macroscópica)" del sistema es posible hallar equilibrio termodinámico. Prigogine llama a esta formulación, una formulación "local" de la segunda ley que se contrasta con la formulación "global" en termodinámica clásica.

Como ejemplo, consideramos el caso de una reacción química que se lleva a cabo en un sistema cerrado. Se tiene que la variación de entropía esta dada por:

$$dS = \frac{dQ}{T} + \frac{Ad\xi}{T} \quad (1.10)$$

A es la afinidad de la reacción ² y esta relacionada con los potenciales químicos de la siguiente manera

$$A = - \sum_{\gamma} \nu_{\gamma} \mu_{\gamma}, \quad (1.11)$$

ξ es la extensión de reacción ³ y ν_{γ} el coeficiente estequiométrico. La ecuación (1.10) se puede descomponer en el flujo de entropía debido a la interacción con el exterior del sistema y la producción interna: $d_e S = \frac{dQ}{T}$ y $d_i S = \frac{Ad\xi}{T} > 0$. La producción de entropía por unidad de tiempo se relaciona con la velocidad de reacción $v = \frac{d\xi}{dt}$ de la siguiente manera:

$$\frac{d_i S}{dt} = \frac{1}{T} Av > 0. \quad (1.12)$$

La ecuación (1.12) es una forma bilineal entre la afinidad y la velocidad de reacción, dicha forma aparece también en el caso de un sistema donde se lleven a cabo ρ reacciones químicas simultáneas:

$$\frac{d_i S}{dt} = \frac{1}{T} \sum_{\rho} A_{\rho} v_{\rho} > 0 \quad (1.13)$$

Prigogine usa este ejemplo junto a otros, como la producción de entropía debida al flujo de calor y reacciones químicas en sistemas abiertos, para calcular la producción de entropía en general, que resulta tener la estructura de una forma bilineal entre las fuerzas generalizadas X_k (afinidades) y los

²Prigogine y Defay [13] definen a la afinidad A como función de $d\xi$ y de dQ' , el calor incompensado, de la siguiente forma: $A = \frac{dQ'}{d\xi}$ que describe a los cambios químicos que ocurren debido únicamente a procesos dentro del sistema. Cualitativamente se refiere a la capacidad de las moléculas y átomos para reaccionar químicamente.

³ ξ es una variable química que cuantifica la variación de la cantidad de especies químicas que intervienen en una reacción, su unidad es el mol.

flujos generalizados J_k (velocidades) debidos a n procesos irreversibles dentro del sistema. Su forma explícita es entonces la siguiente:

$$\frac{d_i S}{dt} = \sum_k J_k X_k > 0. \quad (1.14)$$

Es posible hallar una deducción formal de la ecuación 1.14 desarrollada por Callen [15] basada en el trabajo de Lars Onsager.

Las fuerzas generalizadas y sus respectivos flujos tienen una interpretación cualitativa de bastante utilidad [15]. Una fuerza generalizada es la causa que origina algún proceso dentro del sistema y el flujo es su respectiva consecuencia.

1.2.2. Estados estacionarios fuera del equilibrio.

Cuando un sistema se encuentra en equilibrio termodinámico no produce entropía. Si se asume la formulación local de la segunda ley se observa que si un sistema evoluciona a través de un proceso irreversible tendrá una producción de entropía positiva, por lo que un estado estacionario fuera del equilibrio tendrá producción de entropía no nula y, además, mantendrá sus variables de estado constantes. Alguna restricción externa sobre el sistema, como un gradiente de temperatura, permitirá la aparición de fuerzas generalizadas internas pero los flujos internos no asociados con la fuerza externa desaparecerán.

Si se considera un sistema en donde se lleve a cabo una transferencia de masa y energía entre dos fases a distintas temperaturas, la producción de entropía será generada por una componente originada por el intercambio de masa $J_m X_m$ y otra debida al intercambio de energía $J_{th} X_{th}$. Considerando una relación lineal entre las afinidades y los flujos se obtienen las siguientes relaciones:

$$\frac{d_i S}{dt} = J_{th} X_{th} + J_m X_m > 0 \quad (1.15)$$

$$J_{th} = L_{11} X_{th} + L_{12} X_m \quad (1.16)$$

$$J_m = L_{21} X_{th} + L_{22} X_m \quad (1.17)$$

Las ecuaciones (1.16) y (1.17) se conocen como relaciones fenomenológicas e implican una relación lineal entre las afinidades y flujos, que caracterizan a los procesos irreversibles producidos en el sistema. Estas relaciones lineales tienen validez cuando el sistema se encuentra cerca del equilibrio. El teorema de reciprocidad de Onsager muestra que $L_{ik} = L_{ki}$ con $i \neq k$.

Como el gradiente de temperatura se mantiene constante, el flujo debido al intercambio de energía no desaparece pero el flujo debido al intercambio de materia, al proceder de un proceso interno, se anula en el estado estacionario, $J_m = 0$. Junto a la relación $L_{12} = L_{21}$ la ecuación (1.15) se convierte en:

$$\frac{d_i S}{dt} = L_{11} X_{th}^2 + 2L_{21} X_{th} X_m + L_{22} X_m^2 > 0 \quad (1.18)$$

Tomando la derivada de la ecuación 1.18 respecto a X_m se obtiene:

$$\frac{\partial}{\partial X_m} \left(\frac{d_i S}{dt} \right) = 2J_m = 0 \quad (1.19)$$

Debido a la propiedad general de la producción de entropía, $\frac{d_i S}{dt} \geq 0$, la ecuación (1.19) muestra que $\frac{d_i S}{dt}$ es un mínimo para la condición extremal mostrada. Prigogine generaliza esta propiedad para caracterizar a los estados estacionarios fuera del equilibrio siempre y cuando, las relaciones

fenomenológicas sean lineales y, además, cierto número de afinidades impuestas de manera externa al sistema se mantengan constantes. Otra característica importante de este tipo de sistemas es que sólo existe un estado estacionario, aquel definido por la producción mínima de entropía. En el caso de tener una cantidad finita j de afinidades libres, aquellas que no están definidas por alguna imposición externa, se tiene que el estado estacionario se caracteriza de la siguiente manera:

$$\frac{\partial}{\partial X_j} \left(\frac{d_i S}{dt} \right) = 0 \quad (1.20)$$

Para la siguiente discusión consideremos un sistema cerrado donde se llevan a cabo dos reacciones químicas que estarán caracterizadas por dos variables termodinámicas (p, T) . Consideremos la siguiente definición: $\wp \equiv \frac{d_i S}{dt}$. De acuerdo con la ecuación 1.12 $X = \frac{A}{T}$. Entonces, de la ecuación (1.18) se obtiene:

$$\wp = L_{11} \left(\frac{A_1}{T} \right)^2 + 2L_{12} \frac{A_1 A_2}{T^2} + L_{22} \left(\frac{A_2}{T} \right)^2 > 0 \quad (1.21)$$

Supóngase además, que los coeficientes fenomenológicos son constantes en el tiempo y que en el sistema se satisfacen las relaciones fenomenológicas lineales, de la misma forma que en las ecuaciones (1.16) y (1.17). Luego:

$$\frac{1}{2} \frac{d\wp}{dt} = \frac{v_1}{T} \left[\left(\frac{\partial A_1}{\partial \xi_1} \right)_{pT} v_1 + \left(\frac{\partial A_1}{\partial \xi_2} \right)_{pT} v_2 \right] + \frac{v_2}{T} \left[\left(\frac{\partial A_2}{\partial \xi_1} \right)_{pT} v_1 + \left(\frac{\partial A_2}{\partial \xi_2} \right)_{pT} v_2 \right] \quad (1.22)$$

Considerando la energía libre de Gibbs $G \equiv H - TS$ se tiene que $\mu = \left(\frac{\partial G}{\partial n} \right)_{Tp}$. Por otra parte $\left(\frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_{pT} = \sum_{\gamma} \left(\frac{\partial G}{\partial n_{\gamma}} \right)_{pTn'_{\gamma}} \frac{dn_{\gamma}}{d\xi} = \sum_{\gamma} \left(\frac{\partial G}{\partial n_{\gamma}} \right)_{pTn'_{\gamma}} \nu_{\gamma}$. Finalmente, $A = - \left(\frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_{pT}$. Se puede así, concluir que:

$$\left(\frac{\partial A_1}{\partial \xi_2} \right)_{pT} = \left(\frac{\partial A_2}{\partial \xi_1} \right)_{pT} = - \left(\frac{\partial^2 G}{\partial \xi_1 \partial \xi_2} \right)_{pT} \quad (1.23)$$

Con la ecuación (1.23) se puede escribir la ecuación (1.22) de la siguiente manera:

$$\frac{1}{2} \frac{d\wp}{dt} = \frac{1}{T} \left(\frac{\partial A_1}{\partial \xi_1} v_1^2 + 2 \frac{\partial A_1}{\partial \xi_2} v_1 v_2 + \frac{\partial A_2}{\partial \xi_2} v_2^2 \right) < 0 \quad (1.24)$$

La ecuación (1.24) muestra que el sistema, que se encuentra en un estado de mínima entropía o estacionario, evoluciona, a través de procesos irreversibles internos, de tal forma que se disminuye la producción de entropía.

Prigogine generalizará este resultado para cualquier sistema cerrado y posteriormente para los sistemas abiertos. Ahora se podrá discutir lo que se entiende por la *estabilidad de estados estacionarios*. Al observar la ecuación (1.24) se tiene que es imposible que aparezca algún proceso irreversible dentro del sistema que aumente la producción de entropía, es decir, el sistema no abandonará el estado estacionario como consecuencia de algún proceso irreversible espontáneo que se desarrolle dentro de él. Más aún, si alguna fluctuación lo alejara de ese estado entonces habrá cambios internos que lo hagan retornar a su estado inicial, produciendo así el efecto de estabilidad. En otras palabras, para un sistema con relaciones fenomenológicas lineales, la producción de entropía \wp es una función de Lyapunov (un campo escalar localmente definido positivo), y además tiene estabilidad asintótica (una pequeña perturbación no lo alejará de su estado inicial, de hecho, en algún momento el sistema regresará al estado original).

Se ha visto que en un sistema que se encuentra en un estado estacionario fuera del equilibrio evoluciona hasta alcanzar un mínimo de producción de entropía consistente con las restricciones

externas a las que se somete. Como en un estado estacionario las variables de estado se mantienen constantes en el tiempo, particularmente para la entropía S se tendrá que:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_e S}{dt} + \frac{d_i S}{dt} = 0 \quad (1.25)$$

pero en esta situación $\frac{d_i S}{dt} > 0$ por lo que $\frac{d_e S}{dt} < 0$. Un sistema en un estado estacionario fuera del equilibrio necesariamente mantendrá un flujo de entropía con los alrededores, de tal manera que el sistema les sede entropía, por lo que este tipo de estados no pueden ocurrir nunca en sistemas aislados. Finalmente, para concluir la discusión en este texto sobre estos estados, Prigogine considera el gas de Knudsen, la efusión y difusión térmica para mostrar que existen sistemas que al evolucionar de una situación en equilibrio hacia un estado estacionario fuera del equilibrio presentan una disminución en su entropía, contrario a lo que sucede con los sistemas en equilibrio cuya entropía nunca disminuye.

1.2.3. Sistemas no lineales.

La discusión sobre estados estacionarios en situaciones de no equilibrio se ha basado fundamentalmente en la suposición de las ecuaciones fenomenológicas, el teorema de reciprocidad de Onsager y el caracter constante de los coeficientes fenomenológicos. Una situación donde no se satisfaga alguna de estas suposiciones se considera en el campo de los sistemas no lineales. Dado el caso, el criterio extremal (1.20), no será válido para caracterizar a los estados estacionarios en el régimen no lineal. Sin embargo, es posible encontrar un criterio de evolución para estos sistema, para ello, se separa el cambio en la producción de entropía en dos partes, una debida a cambios en los flujos y otra debida a cambios en las afinidades:

$$d\varphi = d_x \varphi + d_j \varphi = \sum_k J_k dX_k + \sum_k X_k dJ_k \quad (1.26)$$

Se buscará entonces mostrar la siguiente desigualdad:

$$d_x \varphi \leq 0 \quad (1.27)$$

El dominio de válides de esta ecuación es tan amplio como el de la formulación de la existencia de un equilibrio local de la entropía siempre que las condiciones de los alrededores sean independientes del tiempo. La aproximación a la demostración de la desigualdad (1.27) se dará con el estudio de las reacciones químicas. Consideremos un sistema abierto que esta en contacto con diferentes fases caracterizadas a través de su temperatura, su presión y su potencial químico. Además, para cada una, sucede alguna de estas dos condiciones: no intercambia materia con el sistema o su potencial químico es independiente del tiempo. En estas condiciones, el cambio en el número de moles n_γ de una componente, según la ecuación (1.5), esta dado por:

$$\frac{dn_\gamma}{dt} = \frac{d_e n_\gamma}{dt} + \nu_\gamma v \quad (1.28)$$

donde v es la velocidad de la reacción.

Al multiplicar la ecuación (1.28) por la derivada respecto del tiempo del potencial químico de la componente γ , el primer término del lado derecho la ecuación se anulará debido a las condiciones impuestas al sistema. Luego, al sumar sobre todas las componentes, se tiene:

$$\sum_\gamma \dot{\mu}_\gamma \frac{dn_\gamma}{dt} = \sum_\gamma \sum_{\gamma'} \left(\frac{\partial \mu_\gamma}{\partial n_{\gamma'}} \right)_{pT} \frac{dn_\gamma}{dt} \frac{dn_{\gamma'}}{dt} = \sum_\gamma \nu_\gamma \dot{\mu}_\gamma v \quad (1.29)$$

Al considerar la definición de afinidad química A , la ecuación 1.29 obtiene la forma:

$$\sum_{\gamma\gamma'} \left(\frac{\partial \mu_\gamma}{\partial n_{\gamma'}} \right)_{pT} \frac{dn_\gamma}{dt} \frac{dn_{\gamma'}}{dt} = -v \frac{dA}{dt}. \quad (1.30)$$

El resultado de la termodinámica del equilibrio de que el lado izquierdo de la ecuación 1.30 es siempre mayor o igual a cero es análogo a aquel que dice que la capacidad calorífica a volumen constante es siempre positiva [12, 15]. Usando la ecuación (1.26) se obtiene el resultado buscado, que es el más general proporcionado por la termodinámica de procesos irreversibles:

$$Td_X\varphi = vdA \leq 0 \quad (1.31)$$

Debido a la válides de la ecuación (1.27) se deduce el siguiente criterio de evolución, tanto para los sistemas no lineales como los lineales:

$$\frac{d_X\varphi}{dt} \leq 0 \quad (1.32)$$

Los sistemas no lineales tienen propiedades de gran interés para el estudio del origen y evolución de la vida, por ejemplo, en contraste con los sistemas lineales en los que dada una configuración de constricciones externas fijas al sistema éste evoluciona hasta un estado estacionario, en un sistema no lineal las variables que lo caracterizan oscilarán al rededor de ciertos valores promedios. Además, en el régimen no lineal, un sistema puede acceder a múltiples estados estacionarios que tendrán una de las siguientes características: son estables localmente o no son estables en lo absoluto. El segundo caso quiere decir que una fluctuación microscópica puede ser suficiente para cambiar el estado macroscópico del sistema, dicho de otro modo, una fluctuación microscópica será amplificada. Prigogine muestra que en dicha situación el sistema se ordenará macroscópicamente (disminuirá su entropía respecto a sus alrededores) para favorecer la disipación del potencial externo impuesto. La producción de entropía no necesariamente aumentará a través de esta autoorganización macroscópica del sistema.

Otra característica a tomar en cuenta es que la evolución de los sistemas no lineales puede tomar diversos caminos a través de bifurcaciones, lo que impide la existencia de un potencial a optimizar para determinar la evolución temporal del sistema. La única condición de evolución es el criterio evolutivo general, inequación (1.32). Existe evidencia experimental, listada por Michaelian [1], de que la evolución de los sistemas termodinámicos fuera del equilibrio se realiza de tal forma que se optimiza la disipación del potencial externo impuesto.

Para ilustrar las características de los sistemas no lineales antes mostradas consideremos el ejemplo desarrollado por Michaelian [1]. Consideremos un sistema en un estado estacionario que depende de una variable α y caracterizado por un parámetro λ cuya dinámica queda descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial\alpha}{\partial t} = -\alpha^3 + \lambda\alpha = 0 \quad (1.33)$$

Al considerar únicamente las soluciones reales de la ecuación (1.33), se tiene que para $\lambda \leq 0$ la única solución posible es $\alpha = 0$, en cambio, para $\lambda > 0$ hay dos soluciones $\alpha = \pm\sqrt{\lambda}$. Luego, en $\alpha = 0$ existe una bifurcación que lleva a dos soluciones distintas. Al analizar la estabilidad de las soluciones al agregar una perturbación δ se obtiene que la solución $\alpha = 0$ es estable mientras que $\lambda < 0$. Se tiene una inestabilidad puntual en $\lambda = 0$, pero para $\lambda > 0$ los dos soluciones obtenidas son estables. Esto quiere decir que una fluctuación microscópica en $\lambda = 0$ es suficiente para que el sistema evolucione hacia alguna de los dos soluciones posibles. El camino que tome el sistema por alguna de las dos dependerá de la optimización de la disipación del potencial impuesto, lo más probable será que el sistema aumente la disipación.

En sistemas termodinámicos fuera del equilibrio no lineales la evolución temporal del sistema se dará paso a través de una red de bifurcaciones en donde los estados estacionarios son solamente localmente estables. El carácter probabilístico de esta evolución nace de las propiedades de las fluctuaciones microscópicas que puedan aparecer; aquellas que dirijan al sistema en una ruta de mayor disipación de los potenciales externos impuestos serán reforzadas debido a la autoorganización

macroscópica o microscópica del sistema. Dando lugar así, al caracter histórico de esta evolución. La validez general de esta afirmación aún permanece discutida, como se dijo dos párrafos arriba existen sistemas donde esto si ocurre.

1.2.4. Estructuras disipativas.

El camino seguido hasta este punto sobre la termodinámica de procesos irreversibles ha incluido la discusión de algunos conceptos que están íntimamente asociados con el concepto de *estructura disipativa*. Ellos son: autoorganización, estabilidad, inestabilidad, disipación, bifurcaciones. Considere ahora, un sistema alejado del equilibrio, es decir, un sistema en donde el principio de producción mínima de entropía no es válido; un sistema no lineal.

Una estructura disipativa consiste en los procesos por los que evoluciona el sistema a través de las bifurcaciones y los sucesivos estados estacionarios localmente estables que conducen al sistema a una autoorganización macroscópica del material que posee ciertas propiedades especiales. La primera de ellas es “la memoria” que guarda respecto a su estado inicial, que se debe a que su organización macroscópica depende de las condiciones iniciales, internas y externas; conforme evoluciona, el orden macroscópico se adapta a las nuevas condiciones a las cuales está sometido el sistema. Cada bifurcación en su evolución conduce a un orden macroscópico diferente, la decisión de tomar una u otra está guiada por la ruta de mayor disipación que frecuentemente se puede asociar con el criterio evolutivo general, ecuación (1.32), es de esta situación de donde se desprende su capacidad de recordar. La ruta seleccionada por el sistema es lo que se entiende por autoorganización, el orden macroscópico cambiará con el objetivo de aumentar la disipación. Estas estructuras se mantienen a menor entropía que sus alrededores y son productoras de entropía. La aparición del orden macroscópico del material será espontáneo, cuando las condiciones del sistema lleven alguna de las magnitudes que lo describen a través de un valor crítico será entonces que aparecerá una estructura disipativa. Por último, su aparición trae consigo una ruptura en la simetría espacial o temporal.

Las celdas de Bénard constituyen un ejemplo bastante ilustrativo de una estructura disipativa. Consiste en una muestra horizontal de un fluido que se encierra entre dos platos, el superior a una temperatura menor que el inferior. El número de Rayleigh Ra será el valor crítico a superar para la aparición de las estructuras disipativas, que en este caso son celdas de convección de forma poligonal. Cuando la diferencia de temperatura sea menor que algún valor crítico entonces Ra será tal que la transferencia de calor se deberá principalmente a conducción. En esta situación la organización espacial del fluido es homogénea o simétrica. Al sobrepasar dicho valor crítico Ra cambiará de tal forma que la transferencia de calor se llevará a cabo principalmente por convección, una fluctuación en un elemento microscópico del fluido desencadenará la organización macroscópica y aparecerán las celdas de Bénard rompiendo la simetría espacial.

Un cuestionamiento que surge al estudiar las celdas de Bénard es averiguar el tamaño mínimo del sistema al cual se produce éste fenómeno. Conforme la distancia entre los platos se disminuye la transmisión de calor a través de conducción será más dominante, es de esperar que habrá una distancia a la cual la convección sea superflua y no forme parte en el proceso de transmisión de calor. Es en el orden de $10^{-6}m = 1\mu m$ donde esto sucede [1]. ¿Existirán sistemas más pequeños en donde sea posible la fabricación de estructuras disipadoras? La respuesta es afirmativa y los procesos que llevan a la formación de estas *estructuras disipativas microscópicas* son: reacciones químicas y fotoquímicas, cambios de estado moleculares que involucran grados de libertad internos e interacciones con fotones.

Retomando la exposición de Prigogine [12], se calculará la producción de entropía debida a los procesos irreversibles relacionados con los grados de libertad internos moleculares. Consideremos un sistema de una sola componente en el cual las moléculas pueden tener distintos estados caracterizados por γ . Además, $n(\gamma)$ es la densidad de moléculas en el estado γ por lo que $n(\gamma)d\gamma$ es el número de moléculas que se encuentran entre el estado γ y el estado sucesivo $\gamma + 1$. De la ecuación de Gibbs se

tiene:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{T} \frac{dE}{dt} + \frac{p}{T} \frac{dV}{dt} - \frac{1}{T} \int_{\gamma} \mu(\gamma) \frac{\partial n(\gamma)}{\partial t} d\gamma \quad (1.34)$$

Consideremos que cada molécula sólo puede cambiar de su estado γ a uno de sus estados vecinos $\gamma - 1$ o $\gamma + 1$. Si $v_{\gamma+1}$ es la velocidad de la reacción $\gamma \rightarrow \gamma + 1$ entonces se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{dn_{\gamma}}{dt} + (v_{\gamma} - v_{\gamma-1}) = 0 \quad (1.35)$$

Si γ es una parámetro continuo:

$$\frac{\partial n(\gamma)}{\partial t} + \frac{\partial v(\gamma)}{\partial \gamma} = 0 \quad (1.36)$$

Donde $v(\gamma)$ es el número de moléculas que cambian su estado de γ a $\gamma + d\gamma$ por unidad de tiempo o velocidad de reacción. En notación vectorial:

$$\frac{\partial n(\gamma)}{\partial t} = -\text{div} \mathbf{v}(\gamma) \quad (1.37)$$

De la ecuación 1.36 al usar la integración por partes en 1.34 se tiene:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{T} \frac{dE}{dt} + \frac{p}{T} \frac{dV}{dt} - \frac{1}{T} \int_{\gamma} \frac{\partial \mu(\gamma)}{\partial \gamma} v(\gamma) d\gamma \quad (1.38)$$

Y entonces, la producción de entropía es:

$$\frac{d_i S}{dt} = -\frac{1}{T} \int_{\gamma} \frac{\partial \mu(\gamma)}{\partial \gamma} v(\gamma) d\gamma > 0 \quad (1.39)$$

Finalmente, llevando la formulación local de la segunda ley al espacio de los estados internos se tiene que en cada punto de este espacio la producción de entropía es positiva, es decir, si σ^* es la producción de entropía por unidad de volumen en el espacio de los estados internos, entonces:

$$\sigma^* = \frac{\partial \mu(\gamma)}{\partial \gamma} v(\gamma) > 0 \quad (1.40)$$

1.3. Antecedentes.

Uno de los problemas más difíciles respecto al origen de la vida es el de la replicación del ADN al principio del Arcaico sin la posibilidad de intervención de enzimas complejas. Dentro del marco de la Teoría Termodinámica Disipativa del Origen de la Vida, se plantea que existe la posibilidad de que la replicación del ADN fomentaba la disipación de fotones en el UVC y, por lo tanto, fue seleccionada termodinámicamente, particularmente por el criterio evolutivo general, ecuación (1.32), para promover la disipación del potencial fotónico impuesto sobre la superficie de la Tierra durante esa era. Para ello, un mecanismo termodinámico viable tendría que acoplar la replicación con la disipación de estos fotones. En esta sección se presenta una propuesta de mecanismo termodinámico que ha sido observado experimentalmente y que acopla los dos procesos mencionados. El resto de la tesis consiste en un intento por comprender dicho mecanismo a nivel microscópico mediante el análisis de su efectividad como función del pH del solvente en que se encuentra el ADN.

1.3.1. Replicación Asistida por Ultravioleta y Temperatura: UVTAR.

Desde la perspectiva de la Teoría Disipativa del Origen y la Evolución de la Vida se sostiene que la vida se originó a partir de los pigmentos orgánicos que durante el Arcaico fueron creados como microestructuras disipativas encargadas de disipar el potencial fotónico prevalente en esa época (UVC) cuyos fotones pueden romper y crear enlaces covalentes en los pigmentos, es decir,

permite nuevas configuraciones moleculares, ver ecuación (1.35). Los pigmentos se convirtieron en las biomoléculas fundamentales de la vida, como aminoácidos, lípidos, azúcares, el ADN y el ARN, y proliferaron a través de reacciones fotoquímicas autocatalíticas bajo el directivo termodinámico de disipar el potencial fotónico impuesto.

A partir de este enfoque disipativo se contempla resolver problemas relacionados con la replicación del ADN en un ambiente ausente en enzimas. La relación replicación-disipación se discute en [1] y al mecanismo que hace la relación se le conoce como Replicación Asistida por Ultravioleta y Temperatura (UVTAR por sus siglas en inglés) que busca modelar los mecanismos físico-químicos bajo los cuales proliferaron el ADN y el ARN durante el Arcaico.

De acuerdo con [1], en el Arcaico, era en que se cree que apareció la vida en la Tierra, existió una ventana en la atmósfera que permitió la entrada de luz ultravioleta centrada en 260 nm , donde el ADN y el ARN absorben y disipan fuertemente. Debido a la abundancia en la atmósfera de gases de efecto invernadero, como el metano y el dióxido de carbono, la temperatura de la superficie del océano se estima en 80°C con una variación de 3 a 5°C debida al ciclo diurno. Debido a la mayor presencia de CO_2 en la atmósfera y al hecho de que su combinación con el agua produce ácido carbónico y libera iones H^+ , se piensa que los océanos eran más ácidos en esa época, aproximadamente de un pH de 6 a 6.5.

El mecanismo UVTAR plantea una ruta ausente de enzimas para la replicación del ADN simulando los ciclos de día y noche bajo las condiciones físicas y químicas bajo las que se encontraba la superficie del océano en el Arcaico. Durante la mañana, la mayor parte del ADN se encontraba acoplado en dos hebras, conforme aumentaba la cantidad de luz UVC en su superficie el ADN se desnaturalizaba a pesar de encontrarse a temperaturas por debajo de su temperatura de derretimiento (temperatura a la cual el 50 % de ADN de dos hélices se desnaturaliza en ADN de una sola hebra). Posteriormente, en la tarde, cuando la temperatura alcanzaba su valor máximo de $80\text{-}85^\circ$, cercanos a la temperatura de derretimiento de las cadenas cortas de ADN, éste se encontraba en su mayoría desnaturalizado dando lugar al efecto hipercrómico (aumento de alrededor del 20 al 30 % en la absorción en el UVC del ADN debido a su desnaturalización). Durante la noche y a temperaturas más bajas el proceso de extensión se podría completar debida a la presencia de iones Mg^{2+} [1].

1.3.2. Desnaturalización del ADN inducida por luz ultravioleta (UVTAR).

Recientemente la desnaturalización inducida por luz UVC ha sido probada por Michaelian y Santillán [11]. Se vio que la desnaturalización inducida térmicamente es comparable con la inducida por la luz UVC. Esta observación da una posible ruta físico-química de la replicación del ADN sin la necesidad de la presencia de enzimas complejas durante la reacción. Queda la pregunta abierta sobre ¿cuál es el mecanismo activado por la luz UVC que lleva a una molécula de ADN de doble hélice a desnaturalizarse en dos moléculas de ADN de una sola hebra?

La formación de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y de la pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP) inducida por luz ultravioleta lleva a la desnaturalización local del ADN de dos hebras. Los CPD se forman al romperse los dobles enlaces de carbono ($\text{C}=\text{C}$) de dos bases sucesivas de pirimidinas y forman un nuevo enlace covalente entre estas bases consecutivas de la cadena. Los 6-4PP se forman debido al rompimiento de un doble enlace de carbono y de un doble enlace de carbono y oxígeno ($\text{C}=\text{O}$) y al formarse un enlace covalente entre estas dos bases sucesivas. En [11] se midió el porcentaje por unidad de tiempo de desnaturalización debida a la formación de dímeros y se vio que era menor, un 10 % del total, que a la debida al proceso completo de desnaturalización inducido por ultravioleta. Lo que llevó a concluir que debe haber algún otro proceso inducido por fotones que produce esa desnaturalización observada en [11].

1.3.3. Desnaturalización del ADN debida a la foto-deprotonación de sus bases.

Las bases nitrogenadas interactúan entre ellas principalmente mediante puentes de hidrógeno si las bases son conjugadas y mediante interacciones entre dipolo inducido y dipolo permanente superpuestas a enlaces de tipo π si son adyacentes. Éstas últimas interacciones permiten que una molécula de ADN se forme al apilar bases nitrogenadas una tras otra, al conjunto de fuerzas que la mantiene en ésta estructura apilada se conocen como interacciones de apilamiento y están compuestas principalmente por fuerzas de van der Waals y fuerzas hidrofóbicas [14].

Uno de los posibles efectos relacionados con la desnaturalización inducida por luz UVC es la deprotonación del ADN. Al ser sometida a luz ultravioleta la molécula de ADN se ioniza removiendo los electrones en los enlaces π debilitando su estructura apilada. Posteriormente, la deprotonación del radical de ADN en agua debe ocurrir. El decaimiento de los radicales de ADN ocurre lo suficientemente lento, 4 ms de vida media a pH 7 y temperatura ambiente, como para contribuir a la desnaturalización del ADN corto [11].

En condiciones de equilibrio Ageno, Dore y Frontali [16] encontraron que la única fuente de energía lo suficientemente grande para la desnaturalización del ADN en un ambiente alcalino proviene de la “recombinación de hidroxilos con los átomos de hidrógeno de los puentes de hidrógeno entre las bases para formar agua”. Más aún, el efecto hipercrómico (aumento en la absorción de luz UVC del ADN debido a su desnaturalización) debe ser dirigido en parte por la deprotonación. Cuando un protón es arrancado de un puente de hidrógeno del ADN se forma una molécula de agua al combinarse con uno de los iones hidróxido de la solución, sin embargo, el ADN obtiene energía libre almacenada como energía electrostática repulsiva entre los electrones dejados atrás por el protón. Conforme avanza el proceso de deprotonación la molécula se asemeja a un resorte cargado. En la solución debe haber iones positivos en cantidad similar a la de los iones hidróxidos que se concentran en las zonas de donde fue arrancado un protón disminuyendo la repulsión eléctrica otorgando estabilidad eléctrica al ADN por lo que el trabajo de extracción de un protón no aumenta.

Este modelo de desnaturalización por deprotonación en condiciones de equilibrio y en una solución alcalina fue probado en [16] y continúa de la siguiente manera. Puede ocurrir que los dos huecos que se repelen mutuamente generados por la destrucción de un puente de hidrógeno se empujen y un ion tome el lugar del protón expulsado. Pueden entonces, ocurrir dos cosas. La primera es que las bases asociadas a este proceso ya no interactúen fuertemente pues el ion no puede sustituir al protón en el puente, lo que ocasionaría un debilitamiento en la interacción de las bases. La otra es que el ion sustituido sea mucho más grande que el protón y entonces la molécula se deforme en el área próxima debido a la repulsión entre éste ion y las bases deprotonadas. El proceso se repite para todas las zonas deprotonadas dando lugar a la desnaturalización.

En el escenario UVTAR la deprotonación no es únicamente inducida por la solución alcalina mostrada en los experimentos de Ageno, Dore y Frontali, sino también, por efecto de la luz UVC, como se comentó al inicio. En ambas situaciones la concentración de iones tiene un efecto claro en este proceso por lo que las propiedades estructurales del ADN deberán cambiar con el pH. Más aún, al someter al ADN a potenciales externos constantes, como un potencial fotónico como sucede en este experimento, y al considerar las condiciones del océano en el Arcaico, se esperaría que si el ADN se encuentra en una solución de pH cercano al intervalo 6-6.5 entonces aumente la extinción de la luz UVC a través de la muestra, proceso relacionado con la desnaturalización de la molécula y la disipación del potencial fotónico impuesto.

1.3.4. Desnaturalización del ADN debida a la foto-transferencia de protones.

Otro efecto que tiene la luz UVC en el ADN es que la absorción de estos fotones, 260 *nm* por ejemplo, por una base nitrogenada la lleva a un estado excitado de transferencia de carga que decae rápidamente (sub picosegundos) y sin radiación por medio de la transferencia de un proton de una base a otra [17]. La transferencia puede ser hacia su base conjugada o hacia otra base contigua en la misma hélice [18]. El primer caso lleva a la formación de un dímero, lo que llevaría a su monomerización [19]. Si ocurre la segunda posibilidad entonces el enlace de hidrógeno entre las bases se convierte en un par diradical afectando la fuerza del enlace. Debido a que la deprotonación cambia el ambiente electrostático se producen otros efectos colectivos como el cambio en la distribución de los electrones deslocalizados en las bases que debilita a las fuerzas de apilamiento entre bases consecutivas de la molécula de ADN, lo que puede producir su desnaturalización. En este caso, también hay una dependencia de estos efectos con el ambiente iónico (pH) en el que se encuentren las moléculas.

La línea de investigación, que continua los trabajos de [11], a la que se adscribe esta tesis será entonces determinar el o los mecanismos responsables de la desnaturalización del ADN inducida por luz UVC asociados a los cambios de pH en la solución en la que se encuentra. El objetivo de la tesis será realizar los primeros intentos para determinar esos mecanismos, para ello se harán seis soluciones de distinto pH, en el rango de 6.30-8.0, en las que se colocará una muestra de ADN corto (25 pares de bases) y se analizarán con espectrofotometría en el UVC. Las propiedades de extinción asociadas al efecto hipercrómico de las muestras darán la información necesaria para el análisis. Los detalles de este procedimiento se darán en el capítulo siguiente.

Capítulo 2

Método.

2.1. Descripción del experimento.

Se trabajó con ADN sintético de 25 pb sintetizado por cizallamiento centrífugo y obtenido del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFC-UNAM). Fue diseñado para no tener timinas adyacentes, ya que son susceptibles de producir dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) por activación fotónica en el UVC. También tienen temperaturas de desnaturalización y priming ¹ apropiadas para facilitar un posible mecanismo UVTAR emparejado con un ciclo de luz diurna corto que varía la temperatura en aproximadamente 3°C. La cadena de ADN seleccionada fue (5'-3'), CTATGGAGCGGATATACCATGGACG, que tiene 52 % de contenido de GC.

Para formar las doble hélices de ADN se mezclaron oligos complementarios en la misma cantidad (3 µl) en buffer Dulbecco PBS con 6 valores distintos de pH: 7.90, 7.60, 7.28, 7.06, 6.66 y 6.43. Los detalles de la fabricación de estas soluciones se darán en la siguiente sección. Cada solución de buffer contiene 2.7 mM de cloruro de potasio (KCl), 136.9 mM de cloruro de sodio (NaCl), 1.5 mM de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) y 8.9 mM de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄).

3.5 ml de cada solución de ADN fue colocada en un recipiente de cuarzo de 3.5 ml con 1 cm de longitud de camino óptico. Cada recipiente se colocó en un control de temperatura preciso ($\pm 0,01^\circ\text{C}$) Ocean Optics[®] que funciona vía el efecto Peltier por estabilización de flujo de agua de la temperatura para un rápido y preciso control cuando era necesaria la remoción de calor de la solución. La temperatura se monitoreó mediante una sonda ubicada en uno de las cuatro torres soportadoras de la cubeta y en contacto indirecto con ella. Un agitador magnético garantizó la homogeneidad de la temperatura en toda la solución y el paso de todo el ADN a través del rayo de luz (de aproximadamente 3.7 mm de diámetro) en la solución. El agitador también evitó la precipitación del ADN.

La luz UV fue emitida por una lámpara de deuterio de 26 W (217 µW en la muestra) que cubría el rango de 215-850 nm. Era dirigida a la muestra a través de una fibra óptica resistente al UV de 600 µm de diámetro y 30 cm de longitud y a través de una lente de cuarzo. Después de atravesar la muestra la luz fue recolectada por una segunda lente y dirigida a una fibra óptica similar que alimentaba a un espectrómetro de carga acoplada Ocean Optics[®] HR4000CG que cubría el rango 195-1120 nm con una resolución de 0.3 nm. Los tiempos de integración del espectrómetro fueron de 20 ms.

¹Un primer es una secuencia corta de ADN detectable por la polimerasa que permite el inicio de la replicación durante una PCR, en este escenario la temperatura de priming se refiere a la temperatura a la cual un primer se puede unir a una hebra de ADN. En el escenario UVTAR la temperatura de priming se refiere a la temperatura máxima a la que dos hebras de ADN (primers) se pueden unir espontáneamente.

El espectro de extinción $E(\lambda, t)$ (absorción más dispersión) se obtuvo restando la extinción del volumen del buffer sin ADN (extinción de referencia) de la extinción de la solución de ADN correspondiente. La primera se calculó a partir de la medición de la intensidad del espectro de referencia $I_R(\lambda)$ y, la segunda, a partir de la medición de la intensidad del espectro $I(\lambda)$ de la solución del ADN. Se consideró además la contribución del ruido electrónico y de la luz extraviada mediante un espectro oscuro $I_D(\lambda)$, que se obtuvo al cerrar el obturador que bloqueaba el acceso de la luz a la muestra; se sustrajo del espectro de la muestra y del espectro de referencia. La desviación temporal de la línea base de referencia del espectómetro $BD(t)$ se considera al normalizar cada espectro con respecto a las cuentas en la región de 208.0-208.2 nm (donde no se detectaba luz proveniente de la lámpara de deuterio). La ganancia de deriva de la lámpara y el espectómetro $LD(t)$ se consideró al normalizar el espectro de la solución con ADN con respecto a las cuentas en la región 314.8-315.9 nm (longitudes de onda más cortas donde la absorción del ADN es despreciable). La extinción se calculó entonces así:

$$E(\lambda, t) = -\log_{10} \left(\frac{(I(\lambda)*BD(t) - I_D(\lambda))*LD(t)}{I_R(\lambda)*BD(t) - I_D(\lambda)} \right). \quad (2.1)$$

La temperatura de cada solución con ADN fue aumentada (5.0 °C/min) desde la temperatura ambiente hasta los 85 °C y permaneció en esas condiciones durante 10 minutos aproximadamente para conseguir la desnaturalización total de todas las posibles dobles hélices. Posteriormente, con la luz siendo bloqueada por el obturador, la temperatura de la muestra fue disminuida lentamente (0.3 °C/min) hasta los 60 °C. Se dejó entonces reposar a la muestra durante 30 minutos sin luz. Luego se hicieron dos ciclos de apertura y cierre del obturador mientras se monitoreaba la extinción de la muestra. El tiempo en el que permaneció tanto cerrado como abierto el obturador fue de una hora. Finalmente se descendió la temperatura hasta los 25 °C y se cambió el recipiente con la solución con ADN por otro con el PBS sin ADN para medir el espectro de referencia $I_R(\lambda)$. Este espectro no sufre cambios significantes con la temperatura.

2.2. Elaboración de volúmenes de Dulbecco's PBS con diferentes valores de pH.

Los buffers son sistemas acuosos que resisten cambios en su pH cuando son agregadas pequeñas cantidades de ácidos o bases [20]. Esto garantiza que su pH se mantendrá constante a pesar de cambios pequeños en su concentración. Por otra parte, los buffers no soportan cualquier aumento en la concentración de ácidos y bases y por lo tanto hay una región de pH donde funcionan adecuadamente. Para los buffers de fosfato, como el Dulbecco's PBS, esta región es de 5.8 a 8.0 unidades de pH [20]. Los volúmenes de este buffer se consideraron entonces para tener su pH dentro de ese rango que, además, abarca posibles valores del pH del océano en el Arcaico.

Los volúmenes de Dulbecco's PBS con diferente pH fueron hechos en el Laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología de la UNAM (IE-UNAM). Se tomaron 70 ml del buffer y se colocaron en un matraz de Erlenmeyer. Dentro de este matraz se colocó un agitador magnético a bajas velocidades de rotación, sólo lo suficiente para asegurar homogeneidad en la solución. Se monitoreó en tiempo real el valor del pH de la solución con un pH-metro pH 210 Hanna Instruments®. Con una pipeta Pasteur de vidrio se agregaron dos gotas (del orden de 1 µl) de una solución de HCl con concentración 1 M para obtener una solución con pH de 7.06. Se extrajeron 20 ml. Para obtener las soluciones con pH de 6.66 y 6.43 se repitió el procedimiento, agregando el buffer original si era necesario y variando la cantidad de gotas suministradas, comenzando siempre con una. Las soluciones con pH de 7.60 y 7.90 se hicieron de forma análoga pero utilizando una solución de NaOH en concentración 1 M.

Capítulo 3

Resultados y discusión.

3.1. Concentración del ADN en las diferentes soluciones.

Los primeros análisis de los datos obtenidos indicaron que había variaciones en la concentración del ADN en las diversas muestras realizadas. Utilizando los espectros de extinción obtenidos al inicio del primer periodo de luz incidente sobre la solución se obtuvo la concentración de ADN en cada una. En el caso de la que tiene pH 7.28 se hizo el mismo análisis pero con los datos del experimento reportado en [11] y el resultado se marcó con un asterisco. También se recolectó la extinción máxima de cada muestra cuando se encontraba a una temperatura de 85°C, en este caso para la muestra con pH 7.28 solo se reporta la medición obtenida a partir de los datos del experimento de [11]. Los resultados se muestran en la tabla 3.1.

pH	Ext_{max}	λ_{max} [nm]	C [$\frac{\mu g}{\mu l}$]	$Ext_{max85^\circ C}$	$C_{85^\circ C}$ [$\frac{\mu g}{\mu l}$]
6.43	0.395441	258.88	0.020	0.443397	0.009
6.66	0.381048	258.08	0.019	0.420377	0.008
7.06	0.268072	257.54	0.013	0.277190	0.006
7.28	0.735492	258.88	0.037, 0.029*	0.621262	0.012*
7.60	0.438197	257.81	0.022	0.489908	0.010
7.90	0.972606	257.54	0.049	1.011871	0.020

Tabla 3.1: Datos obtenidos del análisis espectrofotométrico de las distintas soluciones de ADN elaboradas. La primer columna corresponde al pH de cada solución, la segunda a la extinción máxima medida al principio del primer periodo de luz incidente, la tercera a la longitud de onda de la extinción máxima correspondiente, la cuarta a la concentración correspondiente medida del ADN en la solución, la quinta a la extinción máxima medida a los 85°C y la sexta a la concentración del ADN medida con el espectro de extinción obtenido a 85°C. Se utilizó el software [21] para las mediciones de la concentración C . Las mediciones marcadas con un asterisco se realizaron con los datos del experimento de [11].

Antes de utilizar la información de las concentraciones para algún tipo de ajuste de los datos obtenidos hay que tomar en cuenta algunas observaciones sobre ella. Se eligió el espectro del principio del primer periodo de luz incidente pues, de acuerdo con el diseño del experimento, en ese momento al rededor de la mitad del material de ADN se encontraba en estado naturalizado y se presenta aproximadamente la mitad del efecto hipercrómico total. Sin embargo, el ambiente ácido o alcalino puede inducir desnaturalización por lo que la diferencia de concentraciones observable para las soluciones a pH 6.43 y 6.66 podría deberse en realidad a la mayor acidez de la primera. Hay que tomar en cuenta que los cálculos de concentración se hacen suponiendo un ambiente a pH 7.0. Por otra parte, considerando los rangos de pH utilizados y a que los casos extremos de acidez o alcalinidad son los que inducen la desnaturalización de manera más considerable [16], se considera

que la relación lineal de la ley de Beer-Lambert entre el pico de extinción y la concentración de cada muestra es suficiente, en primera aproximación, para normalizar los efectos en los datos inducidos por la concentración. Esta normalización también corrige con respecto a los cambios, como función del pH, de la temperatura de desnaturalización del ADN.

Por otra parte, la extinción máxima a 85°C se utilizará para normalizar los espectros de diferencia, sección 3.3, medidos para cada muestra con respecto, únicamente, a la concentración de la muestra. Esta temperatura es ideal para ello pues bajo dichas condiciones las moléculas del ADN se encuentran desnaturalizadas en su totalidad y, por lo tanto, la extinción es función únicamente de la concentración de las hebras sencillas del ADN.

En la figura 3.1 se muestra el ajuste lineal entre el pico de extinción de cada muestra y su concentración. El ajuste dio para la ecuación $Ext_{max} = mC + a$ los siguientes resultados: $m = 19.651 \pm 0.150 \frac{\mu l}{\mu g}$ y $a = 0.007 \pm 0.004$.

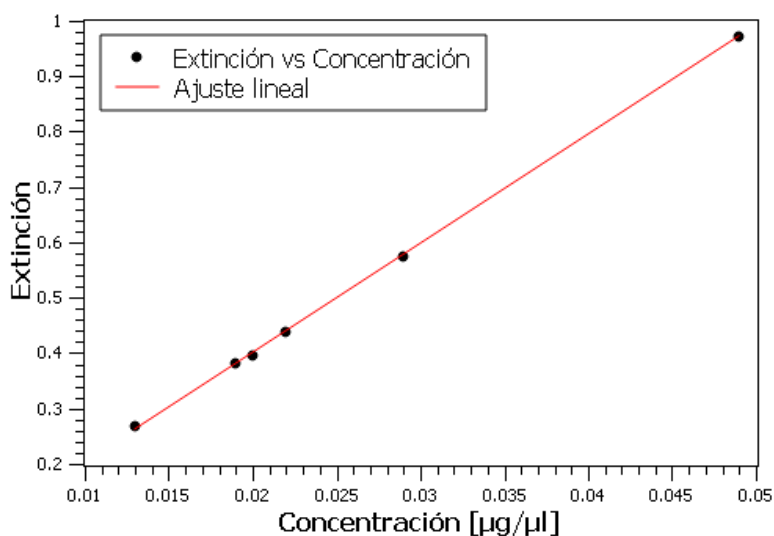


Figura 3.1: Ajuste lineal entre la extinción máxima y la concentración obtenida para cada muestra.

La primer normalización de los espectros de extinción medidos consistió en ajustar, usando la relación lineal obtenida, cada espectro a la misma concentración. La concentración de referencia utilizada fue la correspondiente a la muestra de pH 6.43 pues, al advertir esta variación experimental, se tuvo particular cuidado en su manejo y preparación, por lo que es la más confiable. Si consideramos E_1 a la extinción de la concentración referencia, E_2 a cualquier otra extinción y C_1 y C_2 las respectivas concentraciones se obtiene entonces la siguiente relación:

$$E_1 - a = (E_2 - a) \left(\frac{C_1}{C_2} \right) \quad (3.1)$$

con la cual se puede realizar el ajuste necesario. La segunda normalización consistió en el mismo procedimiento pero utilizando la concentración del ADN medido para cada solución a 85°C.

Los efectos del primer ajuste se pueden observar en la figura 3.2. La gráfica del lado izquierdo muestra el espectro de extinción antes del primer ajuste, aquí es observable la dependencia entre la concentración y la extinción. La gráfica del lado derecho muestra el resultado después de la primer normalización, donde se observa una considerable disminución en los efectos asociados a la concentración.

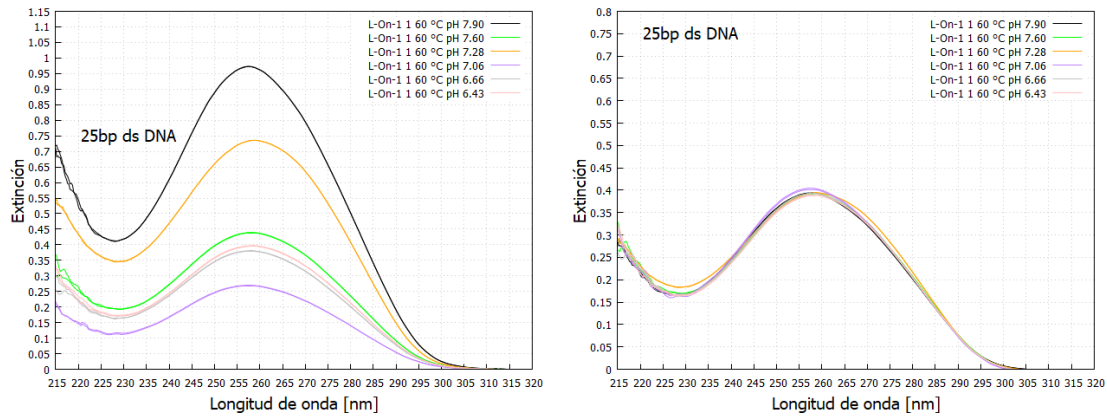


Figura 3.2: En la gráfica de la izquierda se muestra el espectro de extinción al comienzo del primer periodo de luz incidente de todas las muestras antes del primer ajuste en la concentración, mientras que la del lado derecho, muestra el resultado después del ajuste.

3.2. Extinción de luz UVC.

Se analizó la extinción (absorción más dispersión), ecuación (2.1), como función del tiempo, ciclando la luz con el obturador en periodos de una hora abierto y una hora cerrado y promediándola sobre las siguientes regiones de longitud de onda (nm): (2:3), (2:4), ..., (2:14); que corresponden a intervalos de longitud 16 nm comenzando en 234-250 nm y terminando en 474-490 nm. La gráfica con el promedio de cada región para la muestra con pH de 6.43 y 60 °C se muestra en la figura 3.3. Esta gráfica permite identificar la región en donde la extinción es mayor. En todos los casos corresponde a (2:4).

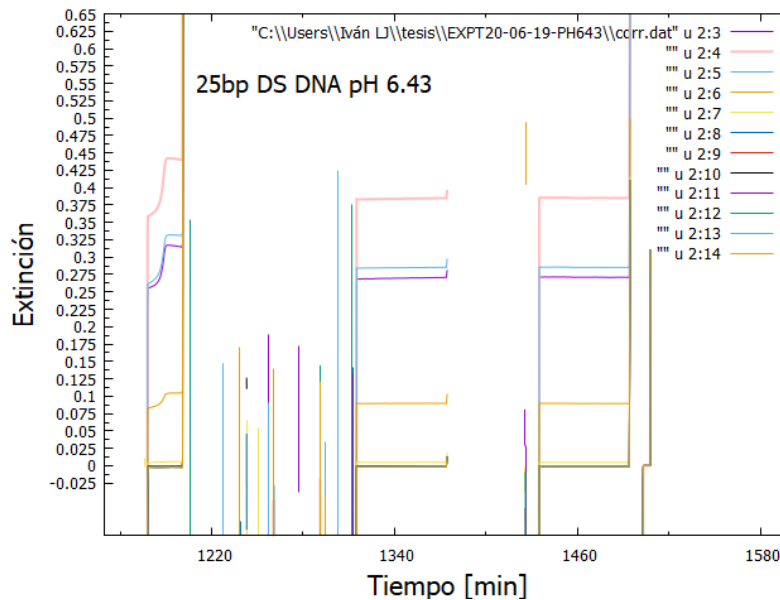


Figura 3.3: Extinción como función del tiempo, ciclando la luz en una hora incidiendo sobre la muestra y una hora bloqueada, promediada en 15 regiones de longitud de onda de la muestra de ADN con pH de 6.43 y 60 °C. Cada color identifica una región de longitud de onda, en este caso la región en rosa es la de mayor extinción y corresponde a 250-266 nm.

El comportamiento de la extinción en función del tiempo de la muestra con pH 6.43 se muestra en la figura 3.4. En el primer periodo en que la luz incide sobre la muestra (línea morada) se registra un claro aumento constante en la extinción que corresponde a la desnaturalización del ADN [11]. Un comportamiento de disminución en la extinción se atribuye a la naturalización del ADN o a la formación de dímeros CPD [11], cuya formación también es dependiente del pH [22]. Sin embargo, dado el diseño de este experimento, la extinción constante indicaría que el ADN se mantiene en un estado estacionario en el cual las moléculas que se encuentran dentro de la región por la cual pasa la luz a través del recipiente se están desnaturalizando, las que están fuera probablemente se están naturalizando, existen dímeros ya formados, otros se están formando y, además, incluye los procesos inducidos por el pH de la solución. La variación no creciente en el segundo periodo de luz incidente sugiere influencia drástica del pH en el proceso de disipación del ADN; nótese que no hay una disminución en la extinción durante el periodo de luz apagada pero aumenta durante los primeros minutos del segundo periodo de luz incidente, posteriormente disminuye un poco y se mantiene aproximadamente constante durante el tiempo restante. La no disminución de la extinción mientras que la luz permanece bloqueada se atribuye a que la acidez de la muestra mantiene al ADN en estado desnaturalizado y a que, incluso, induce su desnaturalización [16], evidencia de ello es que en las demás muestras sí se registró una disminución en ese periodo, salvo en las de pH 7.28 y 7.90 que se discutirán posteriormente, ver figuras 3.7 y 3.10. Debido a que al principio del segundo periodo de luz encendida la extinción no decae de manera drástica y al tiempo en que posteriormente se mantiene constante, se podría considerar que, en efecto, durante la última parte del segundo periodo de luz incidente, el ADN se encuentra en el estado estacionario descrito.

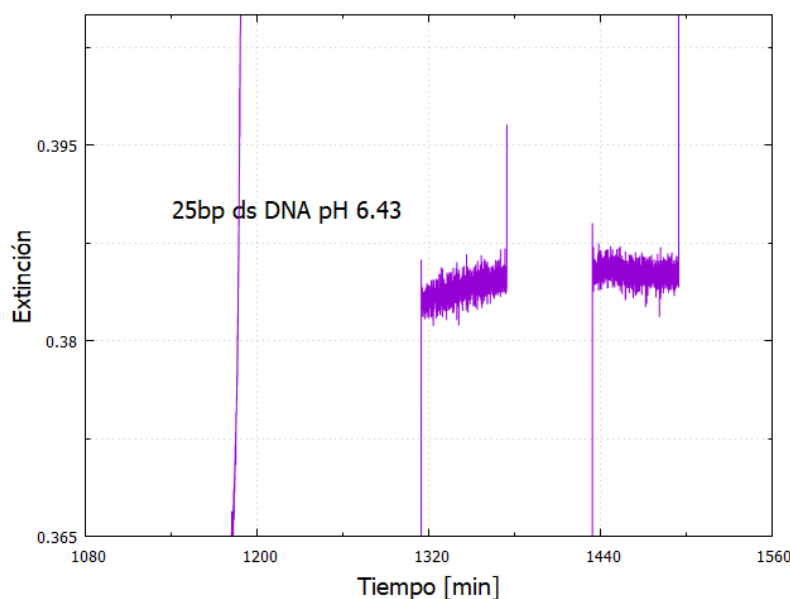


Figura 3.4: Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo. Sólo hay registro de datos durante los periodos de luz incidiendo en la muestra (línea morada). El espacio en blanco corresponde al periodo de la luz siendo bloqueada. En el primer periodo de luz incidente hay un aumento en la extinción a lo largo del tiempo pero en el segundo periodo hay aumentos y descensos.

El comportamiento constante en la extinción durante el segundo periodo de luz incidente aparece en las muestras con pH de 6.43, 7.06, 7.28, 7.60 y 7.90, ver figuras 3.4, 3.6, 3.7, 3.9 y 3.10. Sin embargo, en las soluciones a pH 7.06 y 7.28 este comportamiento no se atribuye a efectos inducidos por el pH sino a efectos originados por los cambios en la concentración.

En la figura 3.5 se observa un comportamiento similar al reportado en [11] con respecto a la

dependencia temporal de la extinción en la muestra con pH 6.66, es un aumento de carácter visualmente constante que indica la desnaturalización del ADN inducida por UVC y una disminución en el periodo de luz bloqueada indicadora de naturalización. Este comportamiento no da pistas sobre los efectos del pH en esta solución.

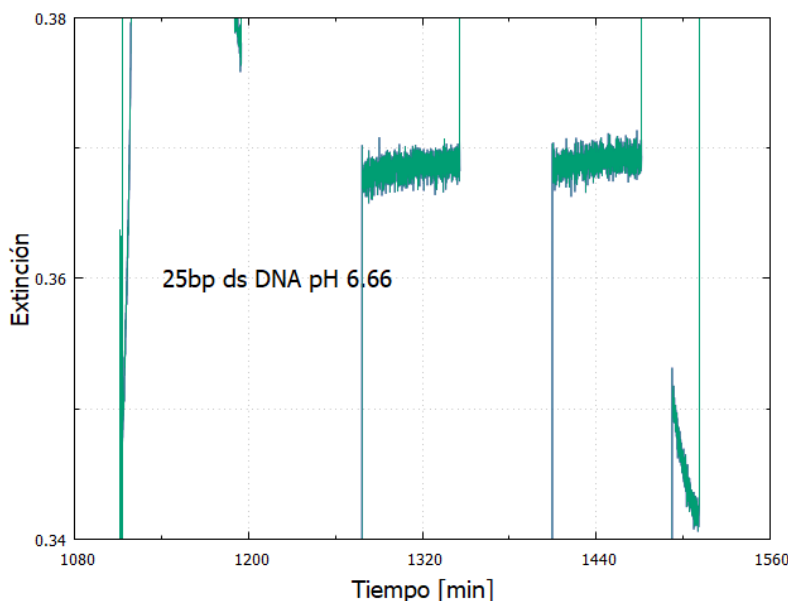


Figura 3.5: Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo. La gráfica (pH 6.66) muestra un aumento visualmente constante en la tasa de desnaturalización en ambos periodos de luz encendida y una disminución en la extinción durante el periodo de luz bloqueada.

La gráfica de la extinción contra tiempo de la muestra con pH 7.06 se encuentra en la figura 3.6, al considerar la magnitud de la extinción de las muestras con pH 6.43 y 7.06 se observa una diferencia aproximada de 0.100 unidades, lo cual es bastante considerable. Esta diferencia se debe a un cambio de la concentración del ADN en la solución correspondiente; la muestra con pH 7.06 tiene una concentración mucho más baja de ADN que la de 6.43, ver tabla 3.1. Al considerar la curva de extinción de la muestra con pH 7.06, se observa una disminución en la tasa de desnaturalización durante el primer periodo de luz encendida, lo que indica que el sistema se está acercando al estado estacionario que se describió anteriormente o a que se están formando dímeros en gran cantidad. Éste aumento en la formación de dímeros sería muy inusual, por lo que se considera que lo que sucede, es que se está alcanzando el estado estacionario en un menor tiempo que en las demás soluciones. Este comportamiento se atribuye a dos causas, la baja concentración del ADN en la solución, o a que durante el proceso de desnaturalización total previo a los ciclos de luz incidente-bloqueada, se dejó a la muestra demasiado tiempo expuesta a la luz UVC y entonces previamente ya se había acercado al estado estacionario. Durante el periodo de luz bloqueada hay una disminución en la extinción debida a la naturalización del ADN [11] y, finalmente, durante el segundo periodo de luz encendida no hay aumento en la extinción, lo que se podría atribuir a que se ha alcanzado el estado estacionario. Que el sistema alcance éste estado se atribuye a la baja concentración del mismo o a la falta de control sobre el periodo de desnaturalización total previo a los ciclos de luz incidente-bloqueada y no a efectos inducidos por el pH de la solución. Esto se discutirá más adelante en esta misma subsección.

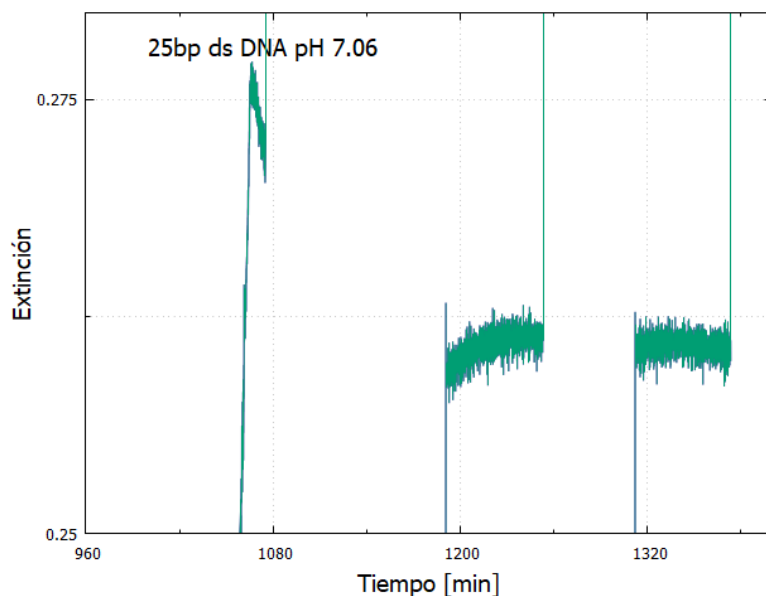


Figura 3.6: Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo. La gráfica corresponde a la muestra con pH de 7.06, muestra una disminución en la tasa de desnaturalización en el primer periodo de luz encendida y un comportamiento no creciente en el segundo.

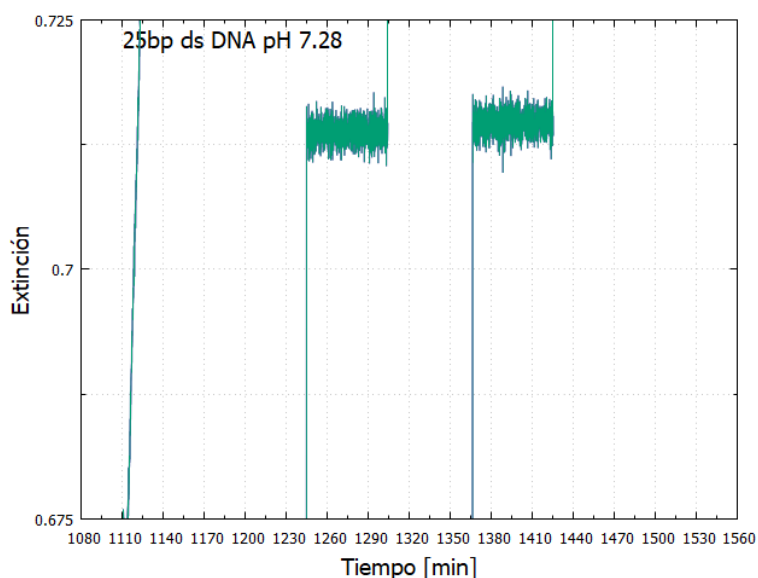


Figura 3.7: Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.28. La gráfica muestra un comportamiento que no es congruente con lo reportado en [11].

En la figura 3.7 se observa la extinción de la muestra a pH 7.28. Las mediciones de una muestra similar bajo las mismas condiciones de temperatura y pH fue reportada en [11], ahí se encontró que la extinción aumenta a una tasa constante durante los periodos de luz incidente y aumenta entre el inicio y el final del periodo de luz bloqueada, ver figura 3.8. En los datos obtenidos del experimento realizado para esta tesis, figura 3.7, ese comportamiento no se muestra y se atribuye a un error de preparación de la solución, probablemente hay mayor concentración del oligo que de su complemento o viceversa. La aparición del estado estacionario en la extinción durante el primer

periodo de luz incidente se podría atribuir a la falta de control sobre el proceso de desnaturalización total del ADN al comienzo del experimento, se discutirá esto más adelante en esta misma subsección. El comportamiento en la extinción de esta muestra se tomará de lo descrito en [11].

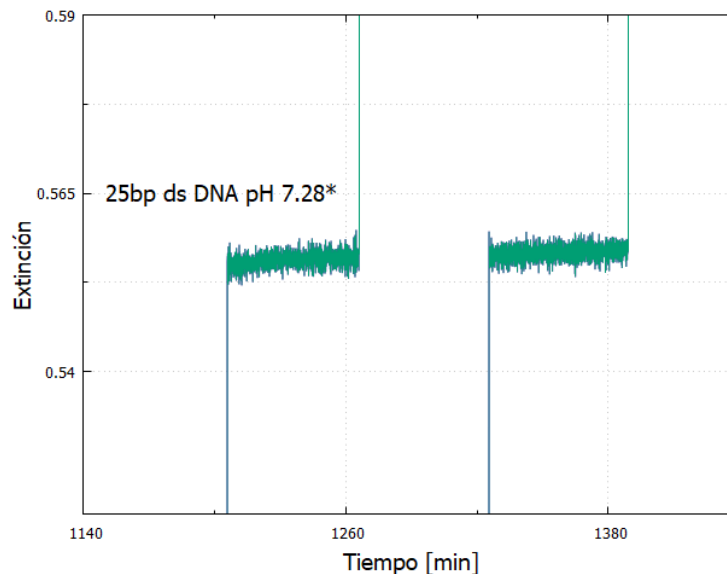


Figura 3.8: Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.28 utilizando los datos del experimento reportado en [11].

En la figura 3.9, se muestra el comportamiento de la extinción de la primer solución con pH alcalino (7.60). Lo más notable de este comportamiento es que hay una disminución considerable en la extinción durante el periodo de luz bloqueada y que, durante el segundo periodo de luz incidente, la extinción se mantiene constante y, por lo tanto, la tasa de desnaturalización del ADN se mantiene nula. Esto sugiere que el ambiente ligeramente alcalino favorece la naturalización del ADN en vez de su desnaturalización o la formación de dímeros. La disminución de la extinción durante el periodo de luz bloqueada también podría indicar que se formaron dímeros [11] en mayor cantidad que en las demás soluciones. Aunque, en efecto, se pueden formar dímeros, el diseño de la cadena de ADN utilizada no favorece su formación por lo que la extinción depende fundamentalmente de la desnaturalización de la molécula. De esta forma, se podría decir que en este caso el cambio en la tasa de desnaturalización, de positiva a nula, se debe a que este ambiente favorece la naturalización del ADN, e incluso obstaculiza e impide su desnaturalización.

La extinción de la solución con pH de 7.90, figura 3.10, muestra un comportamiento congruente con el de la solución con pH 7.60. De [11] se sabe que la luz UVC induce la desnaturalización del ADN, en este caso ese proceso no se ve reflejado en un aumento en la extinción, sino en el estado estacionario en el cual se mantiene durante los dos periodos de luz incidente. Que el sistema se mantenga en ese estado quiere decir que en el ADN se forman dímeros, se naturaliza y se desnaturaliza de tal manera que se alcanza dicho estado. Que no haya cambios en la extinción entre el inicio y el final del periodo de luz bloqueada sugiere que en este pH, en ausencia de luz UVC, las moléculas no se naturalizan, tampoco se desnaturalizan y tampoco se forman dímeros. Dado el caso de que alguno de los procesos mencionados se lleve a cabo entonces sería a través de un proceso reversible, en el cual la extinción no cambia. Los estados estacionarios de los periodos de luz incidente mantienen estas condiciones de equilibrio. La aparición del estado estacionario en la extinción durante el primer periodo de luz incidente se podría atribuir a la falta de control sobre el proceso de desnaturalización total del ADN al comienzo del experimento, esto se discutirá a continuación.

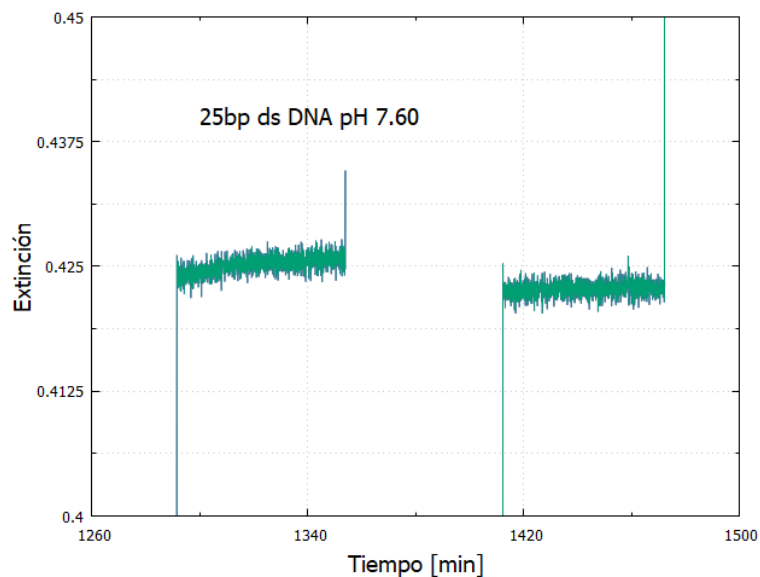


Figura 3.9: Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.60. La gráfica muestra una tasa de desnaturalización visualmente constante en el primer periodo de luz incidente, una disminución notable en la extinción durante el periodo de luz bloqueada y una tasa nula de desnaturalización durante el segundo periodo de luz incidente.

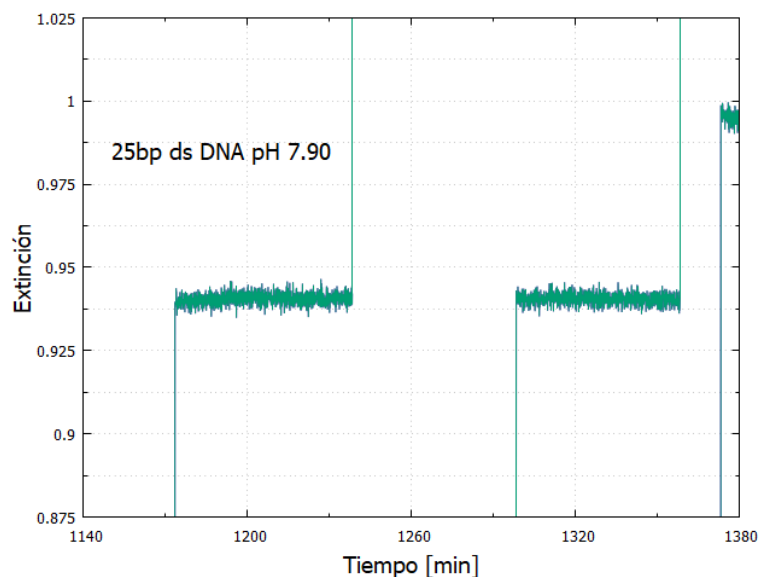


Figura 3.10: Promedio de la extinción sobre la región 250-266 nm en función del tiempo de la solución con pH de 7.90. La gráfica muestra que la extinción se mantiene constante tanto en los periodos de luz encendida como en el de luz bloqueada.

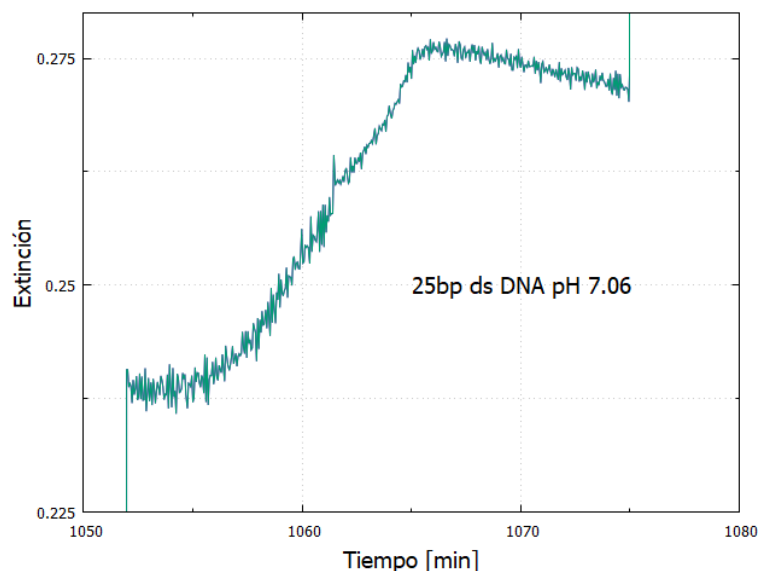


Figura 3.11: Extinción en función del tiempo durante el proceso de desnaturalización total al comienzo del experimento correspondiente a la solución con pH de 7.06.

Ya se ha mencionado que la aparición de un estado estacionario en el primer periodo de luz incidente en las soluciones con pH de 7.28 y 7.90 y el comportamiento en el mismo periodo de la muestra a pH de 7.06 se podría atribuir no a efectos del pH o la concentración, sino, a la falta de control sobre el proceso de desnaturalización total al principio del experimento, en el cual se aumenta la temperatura de la muestra hasta los 85°C, al mismo que la luz UVC incide sobre ella, para posteriormente comenzar a bajar la temperatura a la menor velocidad posible mientras la luz se mantiene bloqueada. Para analizar esto se revisó la extinción de las muestras durante todo este proceso poniendo atención principalmente en su última parte, correspondiente al descenso de la temperatura, figuras 3.11-3.13.

En la solución con pH 7.06, figura 3.11, no se observa que la extinción haya alcanzado o se haya aproximado a un estado estacionario, por lo que el comportamiento de la gráfica de la figura 3.6 bien se podría atribuir a efectos derivados de la baja concentración de ADN en la solución. En el caso de la solución con pH 7.28, figura 3.12, se observa que sí se alcanza el estado estacionario, por lo que la aparición del primer estado estacionario de la figura 3.7 se alcanzó desde este primer proceso, sin embargo, ya se ha dicho que se considerará lo reportado en la literatura. En la solución con pH 7.90, figura 3.13, se observa que se está alcanzando un estado estacionario, por lo que la extinción constante durante el primer periodo de luz incidente de la figura 3.10 podría ser consecuencia de un deficiente control durante esta primer parte del experimento, sin embargo, esta es la única muestra que presenta este comportamiento, por lo que se podría considerar que este pH facilita el proceso de naturalización, inhibe la desnaturalización o ambos.

La gráfica en la izquierda de la figura 3.14 muestra los espectros de extinción de la solución con pH 6.43 al final del primer periodo de luz encendida (azul), al final del periodo de luz apagada (verde) y al final del segundo periodo de luz encendida (gris). El detalle alrededor del pico de máxima extinción se muestra en la gráfica en la derecha cambiando los colores por azul, rojo y morado respectivamente. Se logra observar un aumento en el pico de máxima extinción indicando un aumento en la cantidad de material desnaturalizado.

Todas estas propiedades fueron estudiadas para cada una de las soluciones, sin embargo, un análisis más adecuado es proporcionado por el espectro de diferencia inducido por luz UV como función de la longitud de onda, que otorgará los elementos necesarios para discutir las observaciones

y afirmaciones dichas en esta sección.

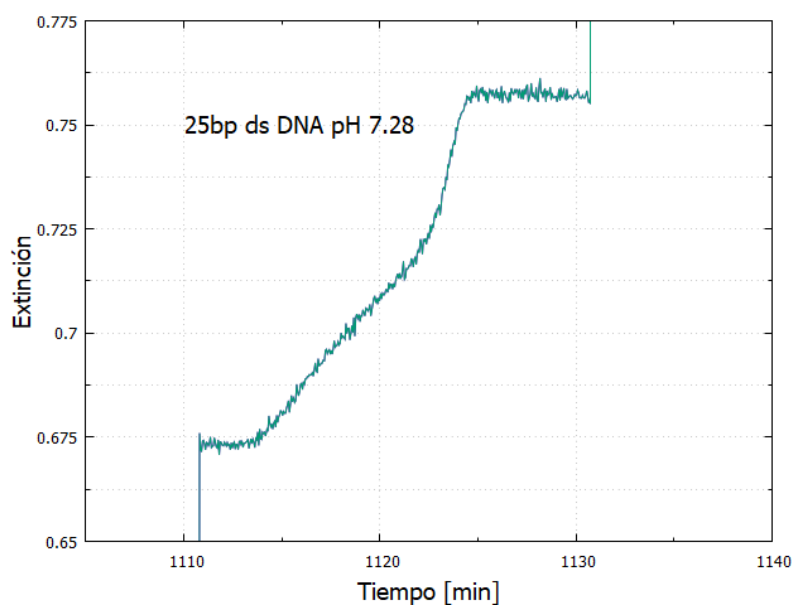


Figura 3.12: Extinción en función del tiempo durante el proceso de desnaturalización total al comienzo del experimento correspondiente a la solución con pH de 7.28.

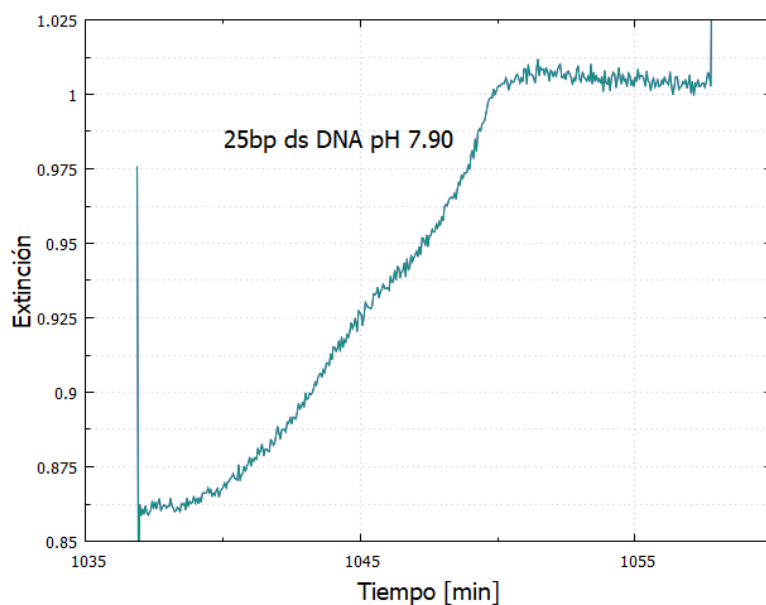


Figura 3.13: Extinción en función del tiempo durante el proceso de desnaturalización total al comienzo del experimento correspondiente a la solución con pH de 7.90.

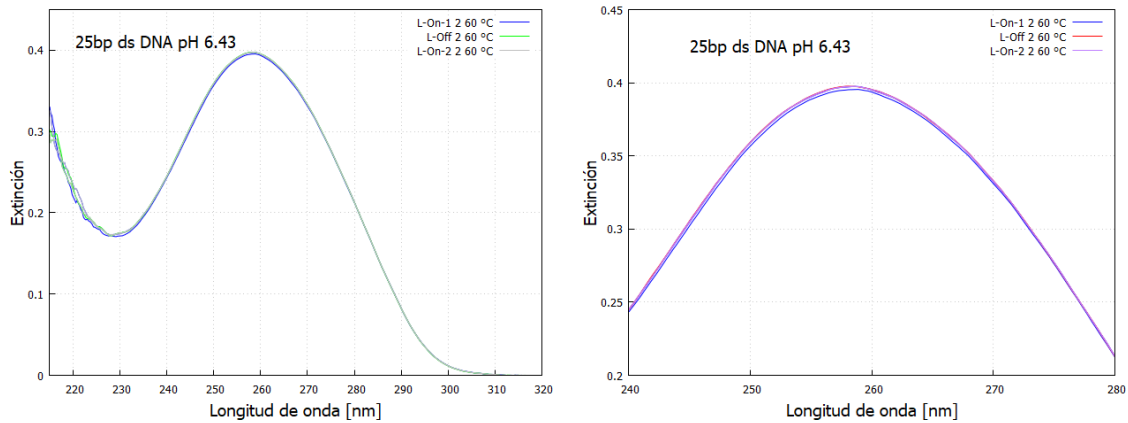


Figura 3.14: Espectros de extinción tomados al final de cada periodo de luz encendida y apagada de la muestra con pH 6.43. La gráfica de la derecha muestra el espectro completo y la de la izquierda el detalle de la región de 240-280 nm.

3.3. Espectro de diferencia inducido por UV.

El espectro térmico de diferencia consiste en tomar la diferencia del espectro de extinción de una muestra de ADN en estado desnaturalizado, a una temperatura mayor a su temperatura de derretimiento, menos el espectro de la misma muestra en estado naturalizado, a una temperatura menor a la de derretimiento [23]. El espectro de diferencia inducido por UVC reemplaza los cambios de temperatura por periodos prolongados de luz UVC incidente o bloqueada sobre el ADN. De esta manera, se toma la diferencia del espectro de extinción al final del periodo de luz incidente o bloqueada (que puede coincidir o no con el estado más desnaturalizado del ADN) y el espectro al inicio (que puede coincidir o no con el estado menos desnaturalizado del ADN), el objetivo es estudiar el proceso de desnaturalización [11].

Como se observó en las figuras 3.4-3.10, en casi todas las soluciones el sistema alcanza un estado estacionario durante el segundo periodo de luz incidente. Para medir el efecto del pH en la desnaturalización del ADN se prestará principal atención al primer periodo de luz incidente, en el cual el proceso no se ve interrumpido por alcanzar el estado estacionario. En la figura 3.15 se muestra el espectro de diferencia obtenido del primer periodo de luz incidente como una línea continua y el espectro de diferencia del periodo de luz bloqueada aparece como una línea punteada. Para cada solución ambos espectros se muestran con el mismo color y, además, se encuentran normalizados con respecto a la concentración y a la temperatura de derretimiento del ADN como función del pH, ecuación (3.1).

Para la muestra con pH 6.43, en líneas rojas, se observa un aumento en la extinción durante el primer periodo de luz incidente en toda la región del espectro graficada. El aumento en la extinción en la región de 240-290 nm se asocia con la desnaturalización inducida por luz UVC [11]. Se observa además, que éste aumento es mayor que en las demás muestras, salvo en la de pH 7.06, líneas verdes, cuyo comportamiento se discutirá más adelante en esta misma subsección. Se registra un aumento en la extinción durante el periodo de luz bloqueada en la región de 240-280 nm que se podría asociar también a la desnaturalización del ADN. Solo las muestras con pH de 7.28 y 7.90 registran un aumento en esta región, líneas punteadas azul y negra respectivamente, sin embargo, se sabe que en el caso del pH 7.90 el aumento se restringe a la región de 240-268 nm por lo que no se puede asociar un proceso de desnaturalización tan fácilmente. El aumento en la extinción durante el periodo luminoso y el periodo oscuro permite afirmar que el pH de 6.43 favorece la desnaturalización inducida por UVC y, además, en las demás soluciones la desnaturalización se ve favorecida en menor medida conforme aumenta el pH (salvo el pH 7.06) o se observa lo contrario.

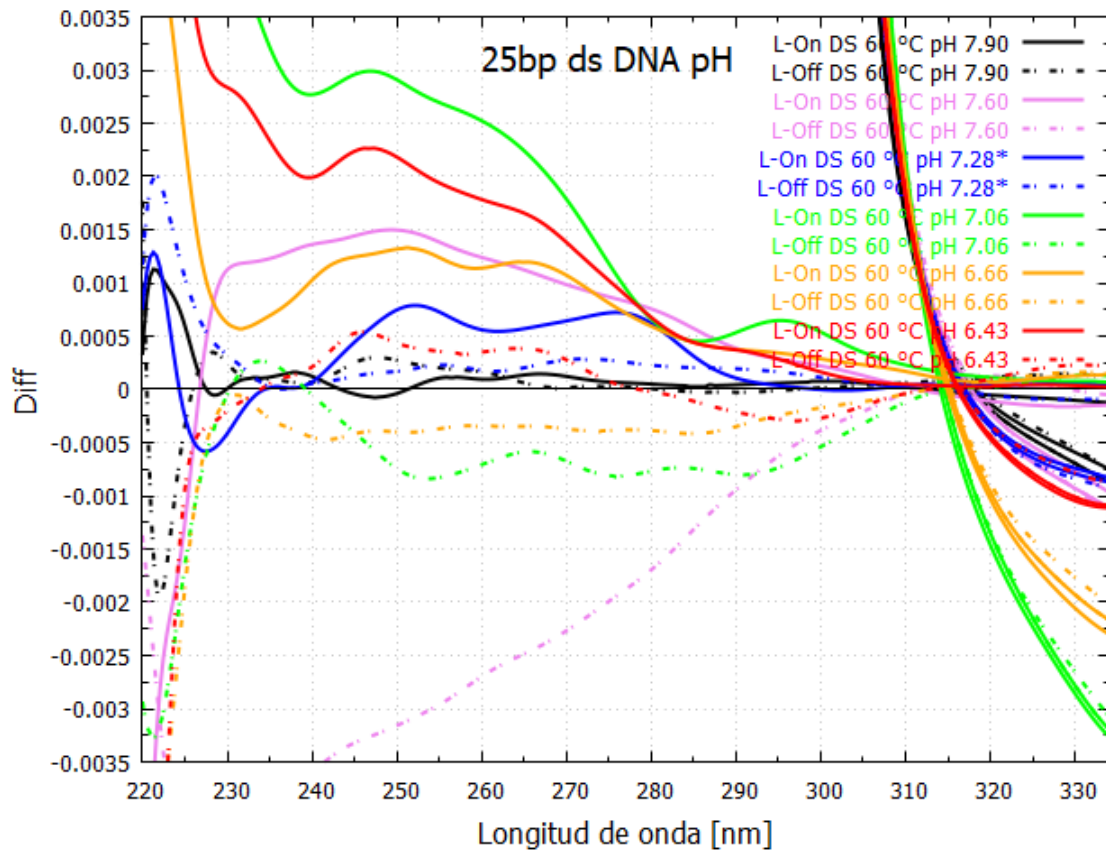


Figura 3.15: Espectros de diferencia de las soluciones analizadas. La línea continua es espectro de diferencia obtenido en el primer periodo de luz incidente mientras que la línea punteada es el espectro de diferencia del periodo de luz bloqueada. Ambos espectros se muestran del mismo color para cada solución. Los espectros se muestran normalizados respecto a la concentración y a la temperatura de derretimiento del ADN en función del pH.

Las líneas naranjas corresponden al pH 6.66, la línea continua tiene una forma similar a la correspondiente a la de pH 6.43 pero es de menor magnitud. Durante el primer periodo de luz incidente se registra un aumento en la extinción en la región de 240-290 nm por lo que aquí también se registra un proceso de desnaturalización inducida por UVC. Durante el periodo de luz bloqueada se observa una disminución en la extinción en toda la región del espectro graficada que se asocia a la naturalización del ADN.

Los espectros de diferencia de la solución con pH 7.06 se muestran con las líneas verdes. Su comportamiento es similar que el de la muestra con pH de 6.66, registra desnaturalización inducida por UVC durante el primer periodo de luz incidente y naturalización durante el periodo oscuro. Se diferencia en que el aumento en la extinción durante el periodo luminoso es mayor que el de todas las demás muestras y en que se registra mayor desnaturalización en el periodo oscuro que en las muestras con pH 6.43 y 6.66. Se esperaría que el aumento en la extinción fuera menor que el de la solución con pH 6.43 ya que ese es el comportamiento general. Hay varios efectos que pudieran influir en el comportamiento particular de esta muestra, y en el de las demás, que se discutirán en la siguiente sección.

Con respecto a la solución con pH a 7.28 (líneas azules) se registró un comportamiento que no es congruente con lo reportado en [11]; el resultado espurio se atribuye a una asimetría en la muestra, lo más probable es que durante su fabricación se vertiera mayor cantidad del oligo utilizado que

de su complemento o viceversa. Los datos graficados del ADN en estas condiciones se tomaron del experimento reportado en [11] y se encuentran señalados por un asterisco. Se observa que hay un aumento en la extinción en la región de 240-290 nm, tanto en el periodo de luz incidente como en el de luz bloqueada, que indica que el ADN se ha desnaturalizado. La desnaturalización inducida por UVC en este caso es menor que en el de las demás soluciones, salvo por la de pH 7.90.

Los espectros de diferencia de la solución con pH 7.60 se muestran con líneas violetas. Lo primero en resaltar es que la curva continua en la región anterior a los 230 nm disminuye mientras que en las demás soluciones con pH distinto aumenta. En el resto del espectro la forma de la curva es similar a las correspondientes a soluciones con pH menores. La magnitud de esta curva es inferior que la correspondiente a la curva de la solución con pH 6.43, indicando que hubo menos desnaturalización inducida por UVC. Por el contrario, la línea punteada tiene una magnitud que es mucho menor que la de las demás, indicando que en el periodo oscuro el proceso de naturalización se ve reforzado.

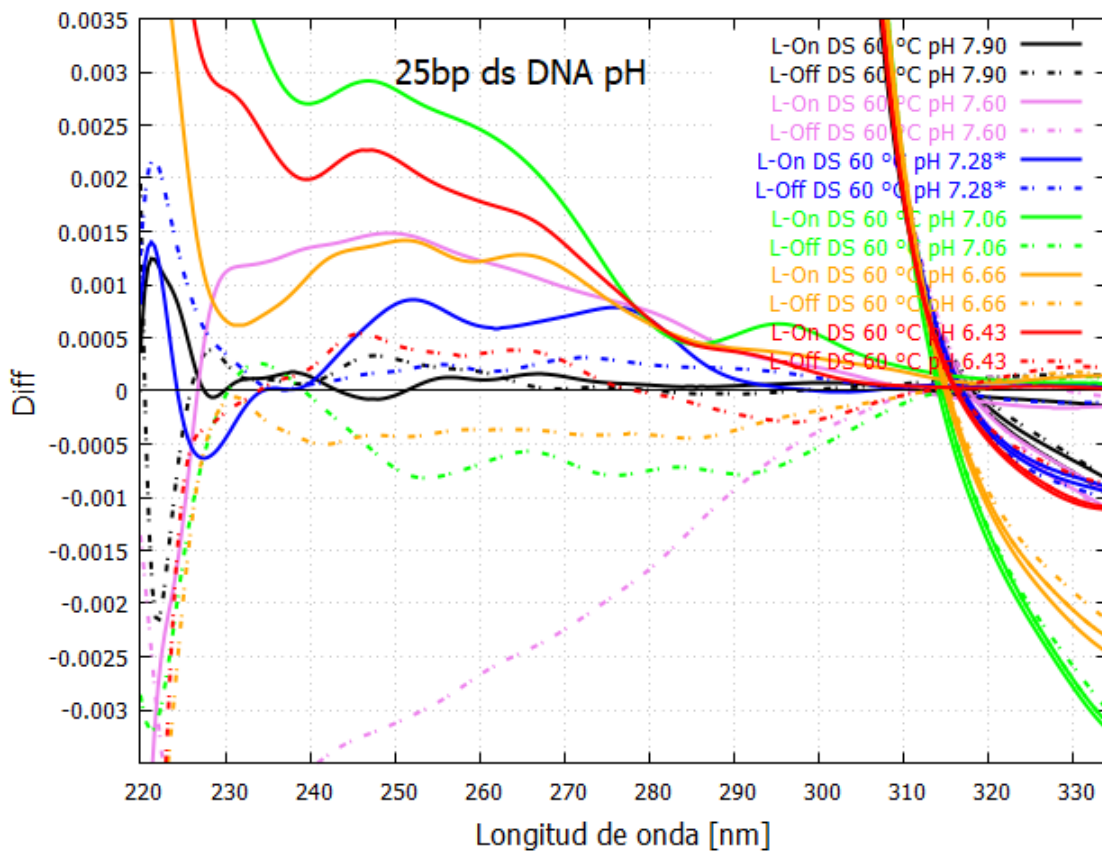


Figura 3.16: Espectros de diferencia de las soluciones analizadas normalizadas con la concentración medida con lo extinción máxima de cada solución a 85°C. La línea continua es el espectro de diferencia obtenido en el primer periodo de luz incidente mientras que la línea punteada es el espectro de diferencia del periodo de luz bloqueada. Ambos espectros se muestran del mismo color para cada solución.

Los espectros de diferencia de la solución con pH de 7.90 se muestran de color negro. Se confirman las observaciones realizadas al analizar la extinción en función del tiempo. Por un lado casi no hay cambios en los espectros de extinción al inicio y al final tanto del primer periodo de luz incidente como del periodo de luz bloqueada. En el caso del periodo luminoso se registra un aumento en la extinción en la región que abarca de 250 a 290 nm que se atribuye a la desnaturalización inducida por UVC, sin embargo, su aumento es muy pequeño por lo que la desnaturalización inducida es

muy reducida. En el periodo oscuro también se registra un aumento en la extinción en la región de 240-270 nm que también es reducido. Se observa que existe cierta simetría entre los aumentos y disminuciones de la extinción en ambos periodos, a un aumento en el periodo luminoso le corresponde una disminución en el oscuro y viceversa, indicando que el efecto promedio de ambos periodos es que no se desnaturaliza el ADN.

Los espectros de diferencia obtenidos durante el primer periodo de luz incidente y el periodo de luz bloqueada normalizados con respecto a la concentración medida a 85°C, ver tabla 3.1 y sección 3.1, se muestran en la figura 3.16.

Aunque la forma de las curvas cambia entre las figuras 3.15 y 3.16, se comportan de manera cualitativamente similar. Las observaciones realizadas anteriormente son congruentes con lo obtenido utilizando esta segunda normalización.

Capítulo 4

Discusión y Conclusiones.

4.1. Con respecto al diseño del experimento.

1. Uno de los mayores problemas que se presentó en este experimento fue la falta de control sobre la concentración de las muestras. A pesar de usar instrumentos precisos se presentaron algunos inconvenientes. Para evitarlos se recomienda rediseñar el experimento de tal manera que solo se prepare una solución de ADN de forma tal que su pH se cambie añadiendo gotas pequeñas de diluciones de HCl o NaOH y así, realizar los ciclos de luz incidente-bloqueada para cada pH. Para ello el método utilizado para fabricar volúmenes de Dulbecco's PBS con diferentes valores de pH no es adecuado pues no se tiene control preciso sobre el valor del pH final después de agregar las gotas, además de que su tamaño deber de ser muy pequeño con respecto al volumen de la solución. Diluir más al ácido y a la base podría resolver el problema del tamaño de la gota.
2. No habrá que descartar errores debidos a cambios de pH en la solución durante las mediciones, principalmente en las soluciones con pH de 7.60 y 7.90, ya que el límite de amortiguamiento superior del buffer utilizado es de pH 8.00. Para el caso de las soluciones más ácidas esta observación es menos preocupante pues el límite de amortiguamiento inferior es de pH 5.80.
3. Habrá que mejorar el control sobre el experimento durante las fases iniciales. La primera, en la que se busca desnaturalizar todo el ADN de la solución aumentando la temperatura mientras incide la luz UVC y la segunda, en la que se disminuye lo más lentamente posible la temperatura sin luz incidente hasta los 60°C para permitir la correcta naturalización del ADN. El control buscará que la formación de dímeros inducida por la luz UVC sea homogénea en todas las soluciones y, así, el estado estacionario se alcanzaría, o no, al mismo tiempo en todas ellas.
4. Es necesario encontrar una manera de controlar otro defecto en la fabricación, que se deriva de la mayor concentración de un oligo que de su complemento o viceversa.
5. Otro posible error de fabricación es la probable contaminación de las soluciones con algún agente enzimático, cuyo efecto sobre las soluciones sea la fragmentación de las cadenas simples o dobles de ADN. Este tipo de agentes son abundantes en ciertas formas de materia orgánica como la piel humana y algunos plásticos. El efecto de estas enzimas en los datos recabados será más notable en las curvas de desnaturalización térmica.

4.2. Con respecto a los resultados.

1. Ya se han dado una lista de fenómenos que influyen en la fabricación de las muestras. Se listarán a continuación los efectos que se han detectado y que tienen efecto directo en las mediciones realizadas:

- a) desnaturalización inducida por luz UVC, que es el efecto buscado;
 - b) efectos del pH en el proceso de desnaturalización inducida, que es el segundo efecto buscado;
 - c) formación de dímeros, tercer efecto buscado;
 - d) efectos causados durante la primer parte del experimento (desnaturalización total y posterior alcance de la temperatura de trabajo), generados por falta de control en ésta primer fase del experimento;
 - e) cambios en la extinción debidos a la concentración de la muestra, causados por la cantidad de ADN vertido en la solución y por diferencias entre la concentración del oligo y de su complemento;
 - f) cambios en la temperatura de derretimiento del ADN generados por el cambio del pH de la solución.
2. De los resultados se puede observar que el pH de 6.43, 7.28 y 7.90 no permiten la naturalización del ADN cuando la luz no incide sobre la solución.
 3. El ambiente ligeramente alcalino parece favorecer la naturalización del ADN en vez de su desnaturalización.
 4. A pH altos la extinción al inicio del segundo periodo de luz incidente no aumenta con respecto a la extinción del final del primer periodo de luz incidente, mostrando que la formación de dímeros se ve favorecida en éste ambiente [11]. Aún así, la formación de dímeros inducida por luz UVC parece no tener una contribución mayor en el proceso de desnaturalización del ADN sintético, que está diseñado para no tener timinas adyacentes.
 5. De acuerdo con las figura 3.15 y 3.16, la mayor desnaturalización de ADN inducida por luz UVC tiene lugar en un pH relativamente neutral de 7.06 y la segunda en un pH ligeramente ácido de 6.43.
 6. Aunque los espectros de diferencia de las figuras 3.15 y 3.16 son cuantitativamente diferentes ambos muestran el mismo comportamiento cualitativo, por lo que el comportamiento general de las muestras en este experimento es independiente de cualquiera de las dos normalizaciones tomadas.
 7. Como la mayor desnaturalización inducida por luz UVC se presenta en el pH más ácido y en el cercano al neutro, la deprotonación inducida por luz UVC y las posterior formación de una molécula de agua al interactuar el protón con una molécula de OH^- no parece ser el principal mecanismo que contribuye en la desnaturalización del ADN inducida por luz UVC. Ver sección 1.3.3.
 8. El hecho de que la desnaturalización del ADN inducida por luz UVC es máxima en pH neutro o ligeramente ácido, podría indicar que la foto-transferencia inducida por UVC de un protón de una base a otra en el doble potencial de hidrógeno cambia la distribución de carga de la molécula y, por lo tanto, la fuerza de la interacción de apilamiento del ADN. Ver sección 1.3.4.

4.3. Implicaciones para la Teoría Disipativa del Origen de la Vida.

Estos experimentos han demostrado que hay una dependencia del pH del solvente en la desnaturalización del ADN inducida por luz UVC. En concreto, parece que las soluciones ligeramente ácidas promueven este fenómeno. Para la Teoría Termodinámica Disipativa sobre el Origen de la Vida, a la que se adscribe este trabajo, este resultado es interesante por el hecho de que es sospechado que los mares en el Arcaico eran ligeramente ácidos debido a la cantidad de ácido carboxílico disuelto en

la superficie de los mares, proveniente de la alta concentración de CO_2 en la atmósfera. Este experimento no fue suficiente para determinar el mecanismo microscópico por el cual la luz UVC induce la desnaturalización del ADN, sin embargo, el hecho de que dicho proceso sea más notable en solventes ligeramente ácidos, implica que los mecanismos que requieran de la deprotonación de las bases probablemente no estén involucrados. Los resultados, sin embargo, apuntan a que la transferencia de un protón del potencial de pozo doble de enlaces de hidrógeno entre una base y su complemento es al menos uno de los mecanismos involucrados en el proceso. Tal transferencia debilitará su interacción de apilamiento fomentando así su desnaturalización. A partir de las observaciones y cuidados listados en la sección 4.1, se planean más experimentos para obtener datos suficientemente robustos como para poder presentarlos en una publicación en una revista especializada.

Bibliografía

- [1] Michaelian, K. (2016) Thermodynamic Dissipation Theory of the Origin and Evolution of Life: Salient characteristics of RNA and DNA and other fundamental molecules suggest an origin of life driven by UV-C light, Self- published. Printed by CreateSpace, Mexico City, ISBN: 9781541317482, DOI: 10.13140/RG.2.1.3222.7443
- [2] Michaelian, K. Thermodynamic origin of life. Preprint at <https://arxiv.org/abs/0907.0042> (2009).
- [3] Michaelian, K. Thermodynamic dissipation theory for the origin of life. *Earth Sys. Dynam.* 2, 37–51 (2011).
- [4] Michaelian, K. Photon dissipation as an indicator of ecosystem health, in *Environmental Indicators* (ed. R. Armon and Osmo Hänninen) (Springer, 2015).
- [5] Michaelian, K. The biosphere: A thermodynamic imperative, in *The Biosphere* (ed. Natarajan Ishwaran) (Intech, 2012).
- [6] Michaelian, K., Microscopic dissipative structuring and proliferation at the origin of life. *Heliyon* 3, e00424 (2017).
- [7] Michaelian, K. & Simeonov, A. Fundamental molecules of life are pigments which arose and co-evolved as a response to the thermodynamic imperative of dissipating the prevailing solar spectrum. *Biogeosciences* 12, 4913–4937 (2015).
- [8] Michaelian, K. Homochirality through Photon-Induced Denaturing of RNA/DNA at the Origin of Life. *Life* 8, 21-?? (2018).
- [9] Michaelian, K. & Rodríguez, O. Prebiotic Fatty Acid Vesicles through Photochemical Dissipative Structuring. ArXiv1809.09551 [physics.bio-ph] 2018.
- [10] Michaelian, K., 2013. A non-linear irreversible thermodynamic perspective on organic pigment proliferation and biological evolution. *J. Phys. Conf. Ser.* 475, 012010.
- [11] Michaelian, K. & Santillán, N., UVC photon-induced denaturing of DNA: A possible dissipative route to Archean enzyme-less replication. *Heliyon* 5, e01902 (2019).
- [12] Prigogine, I. (1967) *An Introduction to the Thermodynamics of Irreversible Processes*, Wiley, New York: Interscience Publishers.
- [13] Prigogine, I. & Defay, R. (1952) *Chemical Thermodynamics*, Great Britain: Longmans, Green & Co Ltd.
- [14] Saenger, W. (1984) *Principles of nucleic acid structure*, Madrid, USA: Springer-Verlag.
- [15] Callen, H., (1985). *Thermodynamics and an Introduction to Thermoestatics*, Madrid, España: Editorial AC.
- [16] Ageno, M., Dore, E. & Frontali, C. The Alkaline Denaturation of DNA. *Biophysical Journal* 9(11):1281-311 (1969).
- [17] X. Wu, T.N.V. Karsili, W. Domcke, Excited-state deactivation of adenine by electron- driven proton-transfer reactions in adenine–water clusters: a computational study, *ChemPhysChem* 17 (2016) 1298–1304.
- [18] J.P. Gobbo, et al., On the deactivation mechanisms of adenine-thymine base pair, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 4089–4097.
- [19] K. Röttger, et al., Is UV-induced electron-driven proton transfer active in a chemically modified A T DNA base pair? *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 4448–4455.

- [20] Mohan, C. (2006). *Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. San Diego, California: EMD.
- [21] Vladimir Cermak, V. C. (s.f.). DNA CALCULATOR [Software]. Recuperado 27 agosto, 2019, de <http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html>
- [22] Yamamoto, Junpei & Nishiguchi, Kosuke & Manabe, Koichiro & Masutani, Chikahide & Hanaoka, Fumio & Iwai, Shigenori, Photosensitized [2 + 2] cycloaddition of N-acetylated cytosine affords stereoselective formation of cyclobutane pyrimidine dimer. *Nucleic acids research*. 39. (2010) 1165-75. 10.1093/nar/gkq855.
- [23] J.-L. Mergny, J. Li, L. Lacroix, S. Amrane, J.B. Chaires, Thermal difference spectra: a specific signature for nucleic acid structures, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e138.