

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

00000
3
21

ESTUDIO SOBRE LA ADSORCION DE BASES PURICAS Y PIRIMIDICAS, Y SUS
CORRESPONDIENTES DERIVADOS DE RIBOSA EN MONTMORILLONITA DE
SODIO, EN EL CONTEXTO DE ORIGEN DE LA VIDA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)
P R E S E N T A

LUCIA PEREZGASGA CISCOMANI

Marzo de 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

A "La Mama", por su fortaleza

A mi padre, por su bondad y constante apoyo

A mis hermanos: Evelia, Flavio, Fer y Ceci, por ser una parte muy importante en mi vida

A Anita, porque por suerte, es la cuñada (yo diría, otra hermana)

A Cami y Martín, por ayudarme a recuperar mi niñez

A mis amigos (que por fortuna son muchos), por estar conmigo

AGRADECIMIENTOS

Terminar esta tesis, representa para mi no sólo el trámite de obtener un título más, si no el cerrar una etapa en mi vida en donde ocurrieron hechos muy importantes que me hicieron rectificar el rumbo, y en gran medida, mi forma de pensar y ver las cosas. En todo este proceso ha intervenido mucha gente a la cual quiero agradecer de manera especial. Espero no caer en una letanía de agradecimientos...

En primer término, quiero agradecer a los miembros del jurado: Dr. Jorge Vázquez, Dr. Fernando Montiel, Dr. León Cázares, Dra. Rebeca Franco y Dr. Guillermo Mosqueira, por tomarse el tiempo para leer la tesis y corregirla, de manera que pueda ser entendible para aquellas personas que la lean (espero) en un futuro.

A la Dra. Alicia Negrón, mi agradecimiento por todos los años de trabajo juntas en los cuales aprendí mucho, por su apoyo, consejos, y por darme la libertad de escoger.

Al Dr. Rosenbaum, director del Instituto de Ciencias Nucleares, le agradezco el apoyo durante el tiempo que permanecí en el instituto, y por creer en mí.

A Andrés Campos, Lulú Arcos, Marie de Merchant, Dr. J.P. Lacleste, Dr. L. Servín, Clementina Castro, Dr. A. García - Carrancá, Olga Medina y Dra. Silvia Galván, que me facilitaron el equipo e instalaciones de sus respectivos laboratorios en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, por aguantar mis acostumbrados aceleres y hacerme agradables los momentos de trabajo. A José Luis Reza, Carmen Peza, Aurelia Maturano y Alejandra Serratos, por sus contribuciones técnicas en el trabajo experimental.

A los Drs. Rafael Moreno, Liberto De Pablo, Rafael Navarro, Eduardo Marambio, Femis y a la M. en C. Susy Castillo, les agradezco las útiles discusiones e ideas experimentales.

A Antonio Lazcano por ser tan divertido y buen amigo, guía académico, y por sus aportaciones a este trabajo, que sin obligación alguna (aunque parafraseándolo: "por ser amigos, que son a los que uno elige"), leyó con gusto.

Al ISSOL (Sociedad Internacional para el Estudio del Origen de la Vida) le agradezco que me ha dado la oportunidad para asistir a los congresos internacionales en origen de la vida.

A mis amigos del ICN: Maru, por estar siempre ahí, a Rubén y "Miguelito" por sus contribuciones en la parte computacional.

A mis amigas de etapas pasadas, que siguen estando presentes y cuya amistad agradezco profundamente: Adriana, Mayda y Aleka; a Sergio, por el reencuentro.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Olga, Paty, Fernando y Alicia en recuerdo de todas las horas de divertido desvelo que pasamos estudiando juntos y en las que tanto aprendimos.

Al Dr. Mario Zurita le agradezco la paciencia para que finalmente pudiera terminar esta tan anunciada tesis.

A mi padre, por ponerme los pies en la tierra de vez en cuando, y por todas las horas que pasó conmigo frente a la computadora, así como a Héctor Bautista y Ernesto Morales para darme a esta tesis una presentación decorosa.

A mis amigos del Instituto de Biotecnología, que en esta nueva y diferente etapa de mi vida, me han enseñado infinidad de cosas: Bertha, Ma. Luisa, Nieves, Chema, Cayita, Claudia, Jordi, Esperanza, el Dr. RAGA, Oswaldo, Roberto, Irma, Rosy, Bere, y a mis compañeros del laboratorio Zurita/Covamubias por aguantarme tantas horas todos los días.

A la DGAPA, CONACyT y a la fundación Perezgasga por las contribuciones económicas necesarias para mi desarrollo académico.

A la tía Catita por fungir como madre en ausencia de "La Mama".

Obviamente, un agradecimiento muy especial a la maravillosa UNAM que me ha brindado todas las facilidades para desarrollarme como estudiante de licenciatura, como profesor, y actualmente como estudiante de posgrado.

Me considero afortunada en tener tantos amigos, razón por la cual, muy seguramente olvidé mencionar a más de uno. Les pido disculpas.

RESUMEN

El estudio del Origen de la Vida se ha dividido principalmente en tres etapas: evolución química, evolución prebiológica y evolución biológica.

El presente trabajo está enmarcado en el contexto de la evolución prebiológica, en particular, nos interesó estudiar el sitio de unión de adenina, adenosina, AMP, ADP, ATP y poli A, como ejemplos de purinas, y de uracilo, uridina, UMP, UDP, UTP y Poli U, como ejemplos de pirimidinas, en montmorilonita de sodio a pHs de 2, 6 y 10, como una aproximación para entender el posible origen de la síntesis de polipéptidos molde - dirigida.

Nuestros resultados muestran 1) que la máxima adsorción se lleva a cabo a pH ácidos y que ésta depende de la geometría del adsorbato y de su pKa; 2) que las purinas se adsorben más que las pirimidinas; 3) que los polímeros se pegan en las orillas del cristal, mientras que las bases, nucleósidos y nucleótidos, lo hacen fundamentalmente en el espacio interlaminar, aunque hay una fracción que se pega en las orillas; y 4) que los mecanismos responsables de la adsorción son el intercambio iónico, las interacciones de van der Waals y los puentes de hidrógeno.

Los datos obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis, cada vez más aceptada, de la importancia de los microambientes para el Origen de la Vida.

NOTA:

Por un error que es sólo mío, se registró el título de esta tesis con un término en inglés: montmorillonita. Por razones administrativas, no fue posible hacer la corrección más que en el contenido. La traducción correcta en español es montmorijonita.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 PARTICIPACION DE LAS ARCILLAS EN LA QUIMICA PREBIOTICA.....	6
1.3 PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LAS ARCILLAS.....	7
1.4 EXPERIMENTOS DE ADSORCION CON ARCILLAS.....	10
OBJETIVO	18
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	19
2.1 MATERIALES.....	19
2.2 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE LAS BASES NUCLEOTIDICAS Y SUS CORRESPONDIENTES DERIVADOS DE RIBOSA.....	19
2.3 DETERMINACION DEL PICO MAXIMO DE ABSORBANCIA A pH 2, 6 Y 10 Y DEL COEFICIENTE DE EXTINCION MOLECULAR DE CADA UNO DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS A LOS pH MENCIONADOS.....	20
2.4 EXPERIMENTOS DE ADSORCION.....	21
2.5 EXPERIMENTOS DE ADSORCION EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON HDTMA.....	22
2.6 EXPERIMENTOS DE ADSORCION DE ADENINA Y POLI A EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON POLIFOSFATOS.....	22
2.7 MEDICION DE LA DISTANCIA INTERLAMINAR DE LA ARCILLA PARA CADA MUESTRA, POR DIFRACCION DE RAYOS X.....	23
2.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	23
RESULTADOS	25
3.1 EXPERIMENTOS DE ADSORCION.....	25
3.2 EXPERIMENTOS DE ADSORCION EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON HDTMA.....	26
3.3 EXPERIMENTOS DE ADSORCION DE ADENINA Y POLI A EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON POLIFOSFATOS.....	28
3.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	29
DISCUSION DE RESULTADOS	31
CONCLUSIONES	35
APÉNDICE 1	37
APÉNDICE 2	40

REFERENCIAS..... 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El árbol de la vida	3
Figura 2. Evolución de los flujos de información en las células	5
Figura 3. Estructura de la montmorilonita	9
Figura 4. Determinación del pico máximo de absorbancia para adenosina y del coeficiente de extinción molecular de adenosina a pH 2	21
Figura 5. Diagrama de flujo de los procedimientos experimentales	23
Figura 6. Gráfica del porcentaje de adsorción de purinas en arcilla natural y en arcilla tratada con HDTMA a pH 2	24

LISTA DE TABLAS.

TABLA I. Porcentaje promedio de adsorción de los compuestos estudiados a los 3 valores de pH	25
TABLA II. Efecto del adsorbato sobre la distancia del espacio interlaminar de la montmorilonita de sodio	26
TABLA III. Porcentaje de adsorción de las bases nucleotédicas y sus derivados en los diferentes sitios de la montmorilonita de sodio	27
TABLA IV. Bandas principales de infrarrojo de los complejos arcilla - compuesto orgánico	29

CAPITULO I.

INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

El origen de la vida es estudiado por una ciencia multidisciplinaria relativamente joven, cuyas bases teóricas fueron establecidas de manera independiente por Oparin (1924) y Haldane (1929). Ambos autores coincidieron en que los primeros organismos vivos eran heterótrofos que se alimentaban de la materia orgánica producida abióticamente, cuyo agotamiento posterior llevó a la aparición de los primeros organismos autótrofos.

Años después de la aparición de estos manuscritos (Oparin, 1972), Oparin publicó una síntesis de los principales postulados de lo que actualmente se conoce como la hipótesis de Oparin - Haldane y que pueden enunciarse de la siguiente manera:

1. Aparición de hidrocarburos, cianógenos y sus derivados en el medio interestelar y en la Tierra Primitiva.
2. Síntesis abiótica de monómeros y polímeros en la Tierra Primitiva. Formación de la sopa primigenia.
3. Formación de sistemas polimoleculares con separación de fases y capaces de interactuar con el medio ambiente. Formación de los protobiontes.
4. Evolución de los protobiontes. Desarrollo del metabolismo y de estructuras moleculares y supramoleculares a partir de la evolución prebiológica. Formación de los eubiontes.

Las dos primeras etapas constituyen el período de evolución química, que se define como una serie de procesos físicos y químicos que explican la formación abiótica de compuestos orgáni-

cos de importancia biológica, antes del establecimiento de la vida. Las dos últimas etapas corresponden a los periodos de evolución prebiológica y biológica, en donde surgen la organización espacial y temporal que caracteriza a los organismos vivos. Al final de la última etapa, surge la evolución biológica con la que empieza a operar la selección natural.

Los experimentos de Miller y Urey en 1953 (Miller, 1953) para lograr la síntesis abiótica de compuestos orgánicos de importancia biológica, bajo condiciones de la Tierra Primitiva, fueron los primeros en demostrar que los postulados de la hipótesis Oparin - Haldane podrían ser abordados experimentalmente; ellos utilizaron una atmósfera reductora, basándose en el modelo de Oparin, pero actualmente muchos geoquímicos favorecen la existencia de una atmósfera constituida principalmente por CO₂, vapor de agua y nitrógeno (Levine, 1982). No obstante, representan el punto de partida de un sinnúmero de investigaciones enfocadas a resolver distintos aspectos dentro de este campo como son: el origen, naturaleza y evolución del Universo, naturaleza de la atmósfera primitiva, fuentes energéticas primitivas, síntesis de compuestos orgánicos bajo condiciones atmosféricas y energéticas diversas, formación de membranas, naturaleza de las primeras moléculas informacionales, fósiles y evolución molecular, entre otros. Como veremos mas adelante, aún quedan muchas preguntas sin respuesta.

Actualmente, el problema del origen de la vida puede ser abordado desde dos perspectivas diferentes: utilizando por un lado la información que tanto la evolución química como la geología pueden proveer acerca de las condiciones existentes en la Tierra Primitiva, que favorecieron la formación de las moléculas importantes para la vida, así como sobre la edad de la Tierra y de los fósiles mas antiguos; y por otro lado, utilizando la información de los organismos actuales y de las técnicas de evolución molecular que permitan inferir algunas de las características de los organismos que precedieron al ultimo ancestro común (Figura 1).

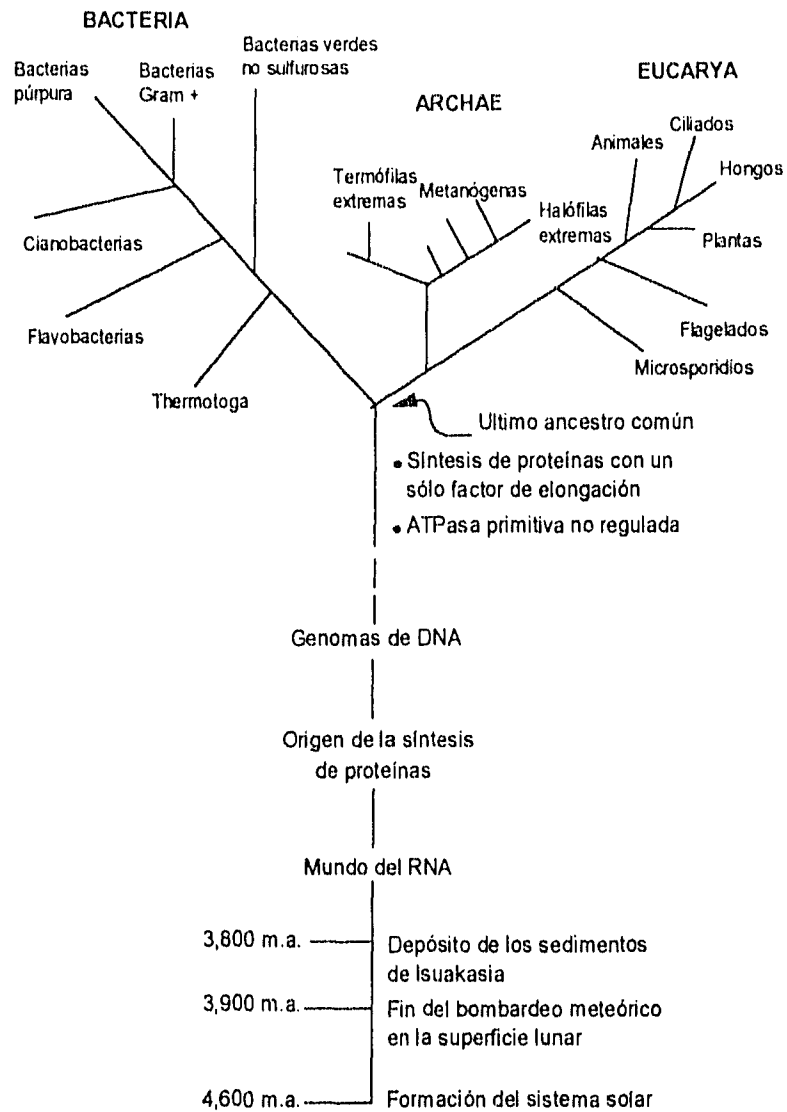


Figura 1. El árbol de la vida.

Modificado de Lazcano, 1986 y de Lazcano *et al.*, 1992.

Sin embargo, todo este cúmulo de información no ha sido suficiente para llenar el hueco existente entre la síntesis abiótica de las biomoléculas, la formación de las membranas, y el origen de las primeras células.

A partir del descubrimiento de las propiedades catalíticas del RNA (Altman, 1978; Cech, *et al.*,

1982), diversos autores propusieron que antes del mundo del DNA, hubo un mundo en el que la molécula informativa y catalítica era el RNA (Alberts, 1986; Gilbert, 1986; Lazcano, 1986). Esta última actividad fue reemplazada posteriormente por las proteínas, las cuales hicieron más eficiente las propiedades de duplicación e información del RNA (Figura 2). Así pues, se ha propuesto que existió un mundo dominado por el RNA y las proteínas, antes que el mundo del DNA. Este desplazó al RNA como molécula informacional debido a varios aspectos: a) el esqueleto fosfodiéster del DNA es más estable en condiciones acuosas que el del RNA, debido a la ausencia del hidroxilo en el carbono 2' del DNA, b) ausencia de actividad de edición de las RNA polimerasas que conduce a una mayor tasa de mutación en genomas de RNA con respecto a los de DNA, c) la información en el RNA puede degradarse por la tendencia de la citosina a desaminarse a uracilo y por la ausencia de enzimas correctoras, d) la radiación UV produce más cambios fotoquímicos en el RNA que en el DNA de doble cadena (efecto hipocrómico) (Lazcano, 1986).

Existe sin embargo, un consenso generalizado respecto a que el mundo del RNA no surgió directamente de las moléculas sintetizadas abióticamente (Orgel, 1986; Joyce, *et al.*, 1987; Joyce, 1989), ya que hay varios factores que hacen difícil pensar en la posibilidad de tener oligómeros estables de RNA en la Tierra Primitiva. Entre ellos, podemos citar el bajo rendimiento en la formación de ribosa a partir de la condensación del formaldehído (Decker *et al.*, 1982), el bajo rendimiento en la síntesis de pirimidinas en relación al de purinas a partir de HCN (Ferris *et al.*, 1978, 1979; Voet y Schwartz, 1982) y, en lo referente a la síntesis de oligómeros de RNA molde - dirigida, la inhibición cruzada por enantiómeros (Joyce *et al.*, 1984) (Figura 2).

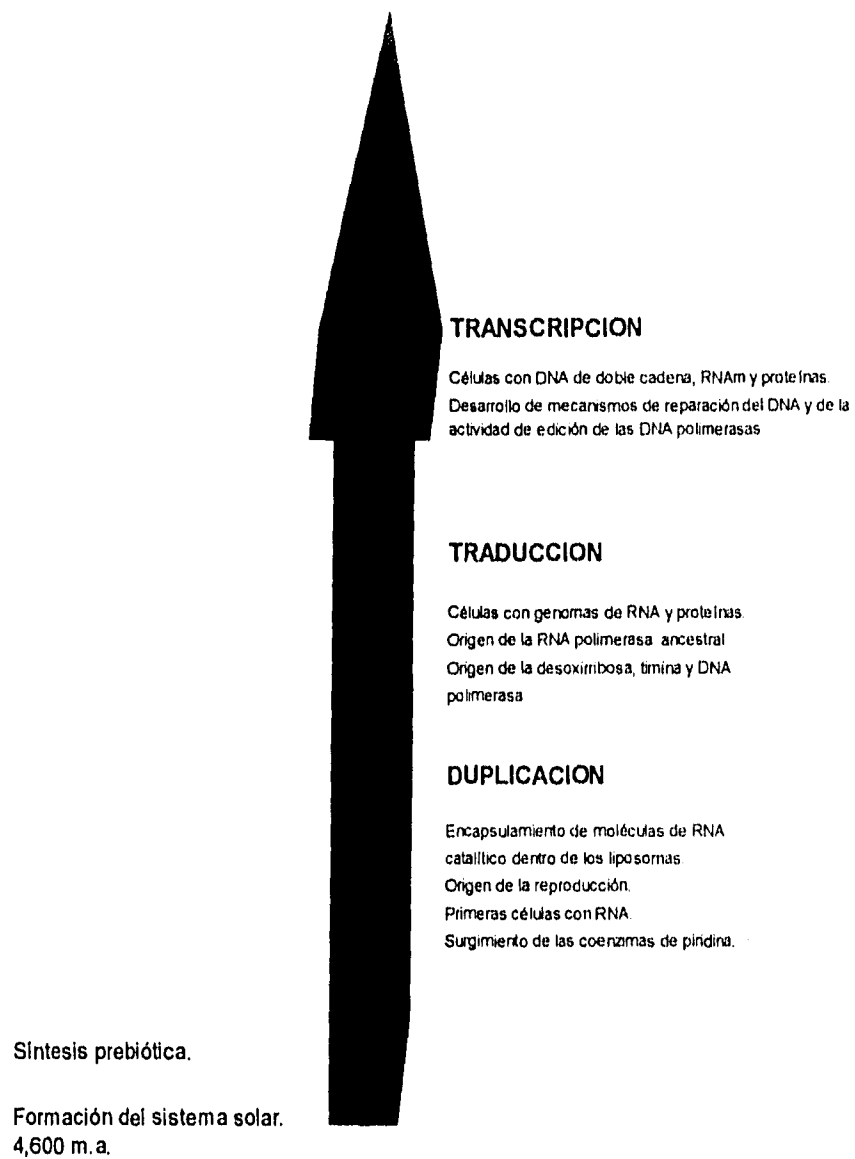


Figura 2. Evolución de los flujos de información en las células.

Tomado de Lazcano, 1986.

Esto ha llevado a pensar a varios autores (Spach, 1984; Joyce, *et al.*, 1987) que el RNA fue antecedido como molécula informacional y catalítica, por moléculas más simples cuya característica principal es que en lugar de ribosa, presentan una molécula aquiral a la cual se le une la base nitrogenada, con los grupos hidroxilo y fosfomonoéster necesarios para la formación del enlace fosfodiéster (aciclonucleósidos). Sin embargo, estos derivados también presentan problemas en la polimerización molde dirigida, ya que tienden a ciclizarse. Esto puede evitarse si los monómeros se unen mediante un grupo pirofosfato en lugar del enlace fosfodiéster, aunque la eficiencia de polimerización es menor (Visscher y Schwartz, 1990). Otro problema muy importante a resolver con este tipo de moléculas, es el de determinar en qué momento se da el cambio a moléculas de RNA, para lo que ayudaría el encontrar fósiles químicos con este tipo de estructuras acíclicas.

1.2 PARTICIPACION DE LAS ARCILLAS EN LA QUIMICA PREBIOTICA.

Otra posible solución al problema de la polimerización molde - dirigida sería la presencia de catalizadores en el medio de reacción. Bernal fue el primero en proponer en 1951, que las arcillas pudieron haber tenido un papel importante en la catálisis de las reacciones prebióticas, al servir como agentes concentrantes en los océanos primitivos, que orientaron a las moléculas durante las reacciones, y protegieron a los productos adsorbidos de la degradación.

Las arcillas fueron de los minerales más importantes en la química prebiótica debido a la relación superficie - volumen relativamente grande, a sus propiedades catalíticas y a su amplia distribución geológica (Anderson y Banin, 1975), además de que fueron muy abundantes en sedimentos que datan del Arqueano (Odin, 1986). De acuerdo a una posible secuencia, las zeolitas aparecieron primero y por estados hidrotermales subsecuentes y procesos diagenéticos a bajas temperaturas, se originaron las demás familias de minerales arcillosos (Garrels y Mackenzie, 1977; Anderson y Banin, 1975). Se ha visto también que las arcillas son muy abundantes en condritas carbonáceas de 4,500 millones de años de antigüedad (Nagy, 1975), por lo que se puede afirmar que estos minerales han sido ubicuos, tanto en tiempo como en espacio, a lo largo de la historia de nuestro planeta.

1.3 PROPIEDADES Y CARACTERISTICAS DE LAS ARCILLAS.

Las arcillas son sedimentos de origen natural cuyas partículas miden menos de 4 micras (Dunbar y Rodgers, 1979) y que forman parte de la familia de los filosilicatos. Están compuestas por sílice, aluminio y agua, y cantidades apreciables de otros elementos alcalinos. Microscópicamente, una arcilla está formada por unidades organizadas en platos paralelos apilados uno encima de otro. Cada plato a su vez, está formado por dos unidades. La primera, tiene dos capas de átomos de oxígeno o hidroxilos, con átomos de aluminio, hierro +2, o hierro +3, o magnesio en el medio. Cada átomo metálico está situado al centro y equidistante a 6 átomos de oxígeno, en forma de un octaedro (capa octaédrica). La unidad estructural mas pequeña contiene tres octaedros. Si todos estos octaedros presentan cationes en el centro, la lámina se clasifica como trioctaédrica; si sólo hay dos ocupados y uno vacante, como dioctaédrica. En la segunda unidad, se encuentra un átomo de silicio en el centro, equidistante a 4 átomos de oxígeno o de hidroxilos, que forman un tetraedro (capa tetraédrica). Esta unidad continúa en las dos direcciones del plano y en una tercera dirección, formando paquetes desde 2 hasta 15 unidades, llamadas tactoides o cuasi-cristales. El número relativo de capas tetraédricas y octaédricas varía en las diferentes arcillas (estructura primaria); esta característica, así como la carga y el tipo de superficie interlaminaar sirven de base para su clasificación en ocho grandes grupos: 1) serpentina - caolinita, 2) talco - pirofillita, 3) esmectita, 4) vermiculita, 5) micas, 6) micas frágiles, 7) cloritas, 8) sepiolita - plagiorskita. La división en subgrupos se hace con base en la composición química y en la geometría de la superposición de las láminas individuales con las interláminas. En la montmorilonita (que es un tipo de esmectita, y que ha sido muy utilizada en experimentos de simulación prebiótica) la proporción de capas tetraédricas y octaédricas es de 2:1 (Bailey, 1986).

Las montmorilonitas presentan un espacio entre una unidad 2:1 y otra, llamado espacio intersticial o interlamelar, en el que se encuentran naturalmente, cationes libres como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} , en ese orden de abundancia (Rao *et al.*, 1980). La distancia basal de dicho espacio, determinada mediante difracción de rayos X y medida de la base de la capa tetraédrica

de una unidad 2:1 a la base de la capa tetraédrica de la siguiente unidad, puede medir cerca de 10 Å en una montmorilonita totalmente colapsada, y se puede expandir por la entrada de agua, otros cationes inorgánicos o moléculas polares, hasta 240 Å (Anderson y Banin, 1975). Esta capacidad de expansión de la arcilla con la entrada de agua, es lo que le proporciona plasticidad y una gran capacidad de adsorción en áreas extensas, que en el caso de las montmorilonitas es de 500 a 760 m²/g (Lazlo, 1987).

Otra propiedad importante de las arcillas, es lo que se denomina sustitución isomórfica de los iones metálicos localizados en el centro de las capas tetraédrica y octaédrica, o en ambas (estructura secundaria). Así, el Si⁺⁴ puede ser sustituido por Al⁺³, P⁺³ o Fe⁺² en la capa tetraédrica y el Mg⁺², Fe⁺², Zn⁺², Ni⁺², Li⁺ y otros, pueden sustituir al Al⁺³ en la capa octaédrica. Estas sustituciones crean un desbalance eléctrico, con una carga neta negativa en las unidades estructurales que se mantiene en toda la escala de pH. Así, las arcillas pueden catalizar reacciones químicas, vía la formación de sitios ácidos de Brönsted o de Lewis en su superficie. Los sitios ácidos de Brönsted se forman por la presencia de protones que ocupan sitios de intercambio en la superficie, o por la disociación de moléculas de agua, asociadas con cationes intercambiables. Mientras mayor sea la relación carga - radio del catión, mayor será también la acidez de Brönsted del ion hidratado. Una arcilla fuertemente ácida, presenta un pH aproximado de 2 y por lo tanto es capaz de protonar bases muy débiles, como la urea. Un decremento en el contenido de agua de la arcilla, aumenta la acidez de Brönsted, probablemente porque incrementa la polarización del metal sobre las moléculas de agua residuales.

Los sitios ácidos de Lewis se pueden presentar en las orillas de la arcilla, en donde los cationes metálicos están disponibles para la aceptación de electrones por parte de un ligando, o ellos mismos pueden funcionar como sitios de Lewis si son aceptores electrónicos. El agua contribuye a la acidez de Lewis por solvatación de los aceptores electrónicos potenciales, por lo que ésta debe eliminarse para crear sitios de Lewis disponibles (Pinnavaia y Mortland, 1986). Estos sitios están distribuidos mas o menos aleatoriamente en cada capa con regiones de alta y baja densidad. Asimismo, la ruptura de enlaces en las orillas de las arcillas y la exposición de hidroxilos estructurales, contribuyen a la carga electrostática total en la arcilla, que es compensada por la presencia de los cationes intersticiales en el espacio interlamelar, que pueden ser intercambiados con otros cationes metálicos (estructura terciaria). Esta capacidad

de intercambio catiónico se mide en miliequivalentes por gramo o por 100 gramos. Lo mismo se observa en el caso de los aniones, cuya adsorción es mas débil ya que se pegan en las orillas del cristal (Mosqueira *et al.*, en prensa) (Figura 3).

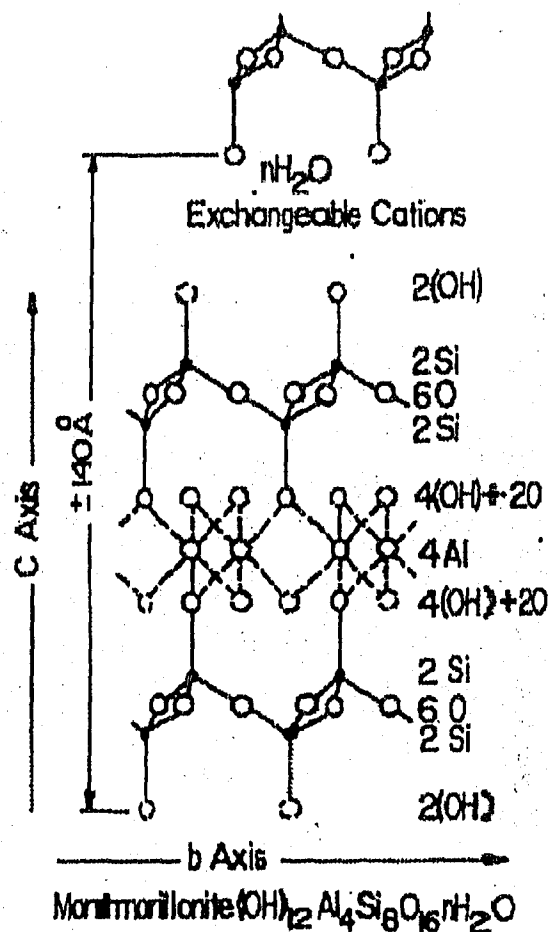


Figura 3. Estructura de la Montmorillonita

La adsorción de una molécula orgánica en una arcilla se puede llevar a cabo mediante fuerzas ion - dipolo en las superficies de la arcilla, por fuerzas de van der Waals o por puentes de hidrógeno. También, se pueden formar complejos con los contraiones del espacio interlamelar, o si la molécula está ionizada, puede experimentar un intercambio catiónico o aniónico con los contraiones presentes naturalmente. Así, los cationes orgánicos grandes, tienden a adsorberse en la arcilla por debajo de su capacidad de intercambio catiónico (Swartz - Allen y

Martijevic, 1974).

Es importante hacer notar el ambiente altamente ácido que se localiza en la interfase arcilla - agua. Esto es debido al gran campo electrostático que se forma entre los cationes intersticiales y la capa aniónica, que provocan que las moléculas de agua se polarizen tanto que se disocian. De esta manera, la relación entre moléculas de iones hidronio y de agua es seis órdenes de magnitud mayor que en el resto del agua, por lo que se obtiene un pH de 1 aproximadamente, en esta zona de la arcilla (Fripiat y Cruz - Cumplido, 1974).

1.4 EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN CON ARCILLAS.

Como se mencionó anteriormente, la participación de las arcillas en la química prebiótica fue sugerida por primera vez por Bernal en 1951. Desde entonces, se han desarrollado diversos trabajos experimentales en los que se han empleado a las arcillas: a) como catalizadores para la síntesis de monómeros de importancia biológica; b) como superficies de adsorción para facilitar las interacciones entre diferentes monómeros y c) para promover las reacciones de condensación de monómeros adsorbidos para formar polímeros, o bien, para promover la duplicación molde dirigida de ácidos nucleicos (Ponnamperuma et al, 1982).

En el primer caso, podemos citar el trabajo de Yoshino et al, (1971), en el que usaron montmorilonita, una mezcla de gases formada por H_2 , CO y NH_3 y calor como fuente de energía, y se obtuvieron diferentes aminoácidos proteínicos; o el trabajo de Shimoyama et al. (1978), en el que utilizaron descargas eléctricas en una mezcla de CH_4 y N_2 en presencia de montmorilonita de sodio suspendida en agua y obtuvieron diferentes aminoácidos proteínicos y no proteínicos, algunos en mezclas racémicas. De la misma manera, se han logrado sintetizar algunas bases nucleotídicas y azúcares. Tales son los trabajos, por citar sólo algunos, de Harvey et al. (1971) que sintetizaron citosina, uracilo y ácido cianúrico a partir de CO_2 , NH_3 y H_2O en presencia de caolinita; y el de Gabel y Ponnamperuma (1967) que mediante el reflujo de formaldehído con caolinita, formaron triosas, tetrosas, pentosas y hexosas.

De entre los trabajos en los que se han empleado a las arcillas como superficies para la adsorción de monómeros, se encuentran el de Friebele et al. (1980), de Shimoyama y Ponnam-

peruma (1980), entre otros, en los que los autores hacen un análisis sobre el mecanismo de adsorción de aminoácidos a pH bajos. También existen estudios sobre la adsorción preferencial de compuestos biológicos y no biológicos en arcillas (Friebele *et al.*, 1981 a y b; Bailey, 1963).

De los estudios existentes sobre la adsorción de péptidos y proteínas en arcillas (McLaren *et al.*, 1958; Armstrong y Chesters, 1964; Albert y Harter, 1973), Ponnampereuma *et al.* (1982) concluyen que los puntos más importantes de estos trabajos relacionados con la evolución química, son los siguientes: 1) los péptidos de mayor tamaño se adsorben más fácilmente que los pequeños, 2) la adsorción es mayor a un pH cercano al punto isoeléctrico del péptido o la proteína y 3) las arcillas tienen una gran capacidad para adsorber péptidos y proteínas y se expanden para incorporar capas dobles de las macromoléculas en el espacio interlamelar.

Con respecto a la adsorción de bases púricas y pirimidicas (que es de nuestro particular interés), y sus respectivos derivados - nucleósidos y nucleótidos - en arcillas, hay una gran cantidad de trabajos en los que las condiciones experimentales son muy diversas, de esta manera se dificulta la comparación de los resultados así como el planteamiento de mecanismos posibles de adsorción. A continuación, se presentan los puntos más importantes de algunos de ellos.

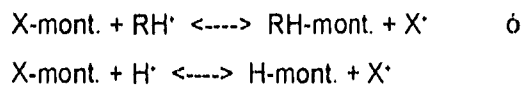
Lailach *et al.*, (1968 a) realizaron un estudio sobre la adsorción de purinas, pirimidinas y sus nucleósidos en montmorilonitas de Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} a pH de 2 a 12 y con una concentración de nucleótidos de 1mM. Sus principales conclusiones son:

1. Las montmorilonitas de Na^+ y Li^+ se comportan de manera similar entre ellas, al igual que las de Mg^{2+} y Ca^{2+} .
2. En las montmorilonitas de sodio y litio, el uracilo, la timina y sus correspondientes nucleósidos, no se adsorben a pH de 1.7 a 11.
3. La adsorción de las moléculas orgánicas depende de varios factores: a) el pH de las soluciones; b) la naturaleza de las moléculas (basicidad y constitución molecular) y c) los cationes inorgánicos intercambiables.
4. Cuando el pH de la solución es menor que el pKa de la molécula orgánica, la montmorilonita se protona porque los cationes interlaminares son substituidos por

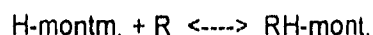
protones y así se forman compuestos neutros, como la RH-montmorilonita (donde R es el compuesto orgánico).

5. A una concentración alta de protones, se reduce la adsorción de compuestos orgánicos, sobre todo en las montmorilonitas de sodio y litio.

6. Cuando el pH es mayor que el pKa y menor a 7, se producen reacciones de intercambio catiónico:

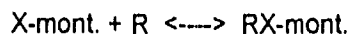


o reacciones de adsorción:



aunque el pH en el espacio interlamilar puede ser equiparable al pKa debido al alto grado de disociación del agua en esta zona, aún cuando el pH de la solución esté dos unidades por arriba del pKa.

7. Si el pH es mayor a 7, la montmorilonita se encontrará casi totalmente asociada a su catión y la adsorción será el mecanismo que impere:



8. La adsorción también puede estar influenciada por la basicidad, el tamaño y estructura estérica de la molécula, su carácter aromático o no, y la coexistencia de estructuras de resonancia.

9. Mientras más básicos sean los compuestos, habrá un decremento en su adsorción a pH altos.

10. Los compuestos aromáticos se adsorben más que los no aromáticos, tal vez por la interacción entre los electrones π de los cationes aromáticos con la capa de oxígenos de los silicatos, o por la deslocalización de cargas positivas en una área extensa.

11. El tamaño es importante en la adsorción, en donde operan fuerzas de van der Waals sobre todo en el caso de moléculas polares grandes.

12. Probablemente la principal razón de que no se adsorban los nucleósidos, es debido a que son moléculas no planares (aunque comparando con sus respectivas purinas o pirimidinas, se esperaría una mayor adsorción).

13. La adsorción de las purinas y pirimidinas es mayor con montmorilonitas monovalentes que con divalentes.

En el mismo año, los autores realizan otro estudio, bajo las mismas condiciones experimentales pero con montmorilonitas de cobre, calcio, cobalto y níquel (Lailach *et al.* 1968b) y concluyeron que:

1. La adsorción de purinas, pirimidinas y sus derivados en montmorilonitas de Co y Ni a pH menor a 6 y en montmorilonita de Cu a pH menor a 3, es similar que con la montmorilonita de calcio, y se lleva a cabo básicamente por procesos de intercambio catiónico.
2. En un intervalo de poco ácido a ligeramente alcalino, la adsorción es debida a la formación de un complejo entre los cationes inorgánicos con las bases y sus derivados, y decrece en el orden $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Ca}$.
3. La adenina se adsorbe fuertemente pero no así el uracilo.
4. En la adenina, parecen formarse complejos bidentados entre los nitrógenos 3 y 9 con los metales de las montmorilonitas de Co, Ni y Cu.
5. Estas montmorilonitas y la de calcio, presentan un grado similar de adsorción con los nucleósidos guanosina, inosina, citidina y adenosina (en ese orden) a pH menor de 5, donde el principal mecanismo de adsorción es el intercambio catiónico.
6. La diferencia en la adsorción entre la adenina y la adenosina puede deberse a que el nitrógeno 9 en esta última, se encuentra unido al carbono 1' de la ribosa, y por lo tanto no está disponible para participar en la adsorción con la arcilla.
7. En la montmorilonita de Fe^{3+} la adsorción de la adenosina parece llevarse a cabo por medio del grupo amino o del N-1.
8. A pH ácidos, la adsorción depende principalmente del intercambio catiónico. Al aumentar el pH, la formación de complejos con los cationes inorgánicos se vuelve el principal mecanismo de adsorción.

Al año siguiente, Lailach y Brindley (1969) estudiaron la coadsorción de purinas y pirimidinas en montmorilonitas de sodio y calcio en un intervalo de pH de 1 a 6. Observaron que la adenina se adsorbe en un 100% en las montmorilonitas de sodio y calcio a pH 2, y a pH 6 en un 90% y que la adenina ocupa un 55% del lugar disponible en el espacio interlamilar de la arcilla. En contraparte, la timina y el uracilo no se adsorben a pH mayor a uno, pero en presencia de adenina, se coadsorben probablemente por medio de puentes de hidrógeno entre las bases (diferentes a los del tipo Watson y Crick) de manera horizontal y no por un apilamiento vertical como proponían Ts'o y colaboradores (1963).

En lo que se refiere a los estudios sobre la adsorción de nucleótidos en arcillas, Burton y Neuman (1971) midieron la adsorción de AMP, ADP y ATP en apatita a pH 5.4 y demostraron que ésta aumenta con el número de fosfatos presentes en la molécula. La carga negativa de los fosfatos y los sitios positivos en la superficie de la apatita, son los causantes de la adsorción.

En 1980, Edelson y Lawless encontraron que el 5'-AMP se adsorbe poco en bentonita de sodio a pH entre 5 y 7.

En este mismo año, Lahav y White (1980) obtuvieron el mismo resultado que Edelson y Lawless, pero con caolinita de sodio; además demostraron que en los polinucleótidos, mientras mayor sea la cadena, mayor es la adsorción.

En 1980, Graf y Lagaly publicaron la adsorción de ATP, ADP y AMP en diferentes arcillas: montmorilonita, beidelita, illita, caolinita y cuarzo. Se utilizaron concentraciones de los diferentes nucleótidos de $1.6 \times 10^{-5} \text{M}$ en NaCl 0.1M a un pH entre 5 y 6, se mezclaron con las diferentes arcillas unos segundos en el vórtex y se dejaron en contacto 25 minutos. Los autores encontraron que para cualquier arcilla de las estudiadas, el ATP se adsorbe mas que el ADP y éste mas que el AMP, aunque el grado de adsorción varía en las diferentes arcillas. Estos resultados los atribuyen a que en el AMP, por ser la adenosina un grupo voluminoso, afecta el intercambio aniónico entre los sitios de intercambio en la arcilla con los fosfatos del nucleótido, debido a un impedimento estérico. Así, mientras mas lejos esté el fosfato terminal de la adenosina (como son los casos del ADP y del ATP), la probabilidad de desplazamiento de los OH- de los iones Al-O- en la arcilla por los fosfatos, es mayor.

Asimismo, observaron que si se trata a la montmorilonita de sodio con difosfato de sodio, antes de adsorber los nucleótidos, aumenta la tasa de recuperación de los mismos de 0 a 38% cuando se lavan las arcillas con agua o amortiguador Tris hirviendo, para provocar la desorción.

En todos estos estudios, el interés primordial de los autores es explicar el o los mecanismos

por los cuales se adsorben las bases púricas y pirimídicas, así como sus derivados en diferentes tipos de arcillas. A pesar de que las condiciones experimentales y el tipo de arcillas varían muchas veces de un trabajo a otro, de todos ellos se puede concluir que la adsorción es dependiente del pH y que a pH ácidos el intercambio catiónico es el mecanismo más importante. A pH neutro, la transferencia protónica es la que provoca la adsorción y a pH básicos, la adsorción se lleva a cabo por medio de las interacciones con metales inorgánicos o metales de transición en las superficies de la arcilla. El tamaño y la forma de las moléculas determina parcialmente el grado de adsorción, las purinas son las que más se adsorben, con respecto a las pirimidinas. En las moléculas más grandes, las fuerzas de van der Waals son mayores, aunque también puede existir un impedimento estérico para su adsorción.

A principios de la década de 1980, Ferris y su grupo enfocaron sus investigaciones al estudio de la adsorción de bases púricas y pirimídicas y sus derivados, en montmorilonitas homioónicas, de sodio, zinc o cobre, con el propósito de ver el efecto del tipo de ion en la adsorción y utilizaron amortiguadores para mantener constante el pH, como el PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis-2-etanosulfónico), el HEPES (ácido N-2- hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico) y el MES (ácido morfolin-N-2-etanosulfónico). Además, otro de los objetivos de estos investigadores es estudiar el papel de las arcillas como catalizadores prebióticos para la formación de oligómeros, o en la polimerización molde - dirigida de mononucleótidos con base en la interacción montmorilonita - polinucleótido.

En uno de estos trabajos (Ferris y Hagan, 1986), se estudia la unión de AMP a la montmorilonita de Zn^{2+} , en presencia y ausencia de PIPES y HEPES 0.2 M. Los autores observaron que la adsorción es mayor cuando está presente cualquiera de los amortiguadores, que en su ausencia, lo que se ve reflejado en los valores de las distancias medidas por difracción de rayos X del espacio interlamilar, que corresponden a entre 13 y 15 Å, para el primer caso, y de 12.8 Å, en el segundo. Esto lo explican por medio de un modelo, en el que se forma un complejo entre los iones de Zn^{2+} con el PIPES, en diferentes orientaciones en el espacio interlamilar, que contribuye a la adsorción del AMP en esta zona (esto es, que se da un fenómeno de coadsorción).

En un estudio posterior (Ferris, *et al.*, 1989a) sobre la adsorción de nucleótidos y polinucleóti-

dos en montmorilonita de sodio y cobre, en presencia de PIPES 0.2M y electrolitos como NaCl 0.2M y $MgCl_2$ 0.075M, los autores publican que la unión de los derivados de adenina a la montmorilonita de sodio crece en el siguiente orden: 5'-AMP, 3'-AMP, 5'-ADP < adenosina < purina, adenina. En el caso de los derivados de la citosina, que se unen menos fuertemente que los de adenina, el orden es el siguiente: 5'-CMP < citidina < citosina. El uracilo y sus derivados también presentan una unión menos fuerte que en el caso de los correspondientes derivados de adenina.

Cuando se utilizó montmorilonita de cobre, el AMP presentó una unión mas fuerte que la adenosina y lo mismo se observó para el UMP y la uridina, con lo que se demostró que el ión es otro factor importante para la unión de los nucleótidos. Asimismo, los homopolímeros de RNA (poli U y poli C), presentaron una unión fuerte a las montmorilonitas de cobre y sodio, que se incrementa en presencia de $MgCl_2$, por lo que no sólo la fuerza iónica sino también la presencia de iones divalentes son importantes. Al aumentar el pH y la temperatura, la unión disminuye.

Al estudiar la unión de mononucleótidos a complejos de arcilla - polinucleótidos, observaron una dependencia térmica mucho mayor en la unión del 5'-AMP al complejo arcilla - poli U, con respecto a la observada en la arcilla sola, lo que indica una unión del tipo Watson - Crick entre el AMP y el poli U, el cual debe unirse a la arcilla vía el grupo fosfato o mediante los hidroxilos de la ribosa, mas no por interacción del anillo del uracilo. Esta misma dependencia térmica se observó en la unión entre el 5'-GMP con el complejo arcilla - poli C.

En ese año, los mismos autores publicaron otro trabajo sobre el papel de la montmorilonita de sodio y de cobre en la catálisis de la formación de dímeros de 5'-AMP, en presencia de carbodiimida soluble (EDAC) como agente condensante (Ferris *et al.*, 1989b). Los productos que contienen el enlace fosfodiéster se forman a diferente fuerza iónica, pH y temperatura, cuando se utiliza montmorilonita de sodio como catalizador, mas no cuando se usa montmorilonita de cobre. Un pH ácido es esencial para la formación del enlace fosfodiéster en presencia de carbodiimida. De esta manera, proponen que dos monómeros de 5'-AMP próximos entre sí se unen a la superficie de la arcilla por medio de los grupos amino de las bases, de manera que quedan libres los grupos fosfato y OH^- para que se lleve a cabo el enlace fosfodiéster. Los

protones necesarios para la reacción mediada por carbodiimida, entre los grupos fosfato y OH- de moléculas de 5'-AMP proximales, son provistos por la arcilla, por lo que mientras mas sitios ácidos hayan en la arcilla, la catálisis es mayor.

Como vemos, en este tipo de estudios se utilizan arcillas con diferentes iones intercambiables para hacerlas catalíticamente mejores, así como amortiguadores para mantener constante el pH durante las reacciones. Sin embargo, si se quiere evaluar el posible papel de las arcillas en la química prebiótica, se debe tomar en cuenta la abundancia relativa de los diversos tipos de minerales arcillosos, así como su existencia natural en la Tierra Primitiva. En cuanto al tipo de amortiguadores usados en estos experimentos, es muy poco factible que hayan estado presentes durante la etapa de evolución química.

Al considerar toda esta información, nos planteamos el siguiente objetivo.

OBJETIVO

El presente trabajo está enmarcado en el contexto del origen de la vida, en particular, en la etapa de evolución prebiológica. Como ya se mencionó, existen una gran cantidad de trabajos de investigación tendientes a dilucidar las posibles condiciones que dieron origen a la síntesis de polímeros en la Tierra Primitiva. Sin embargo, las condiciones experimentales utilizadas en cada uno de ellos, son muy diversas. Nosotros pensamos que si podíamos determinar el sitio de unión de los componentes de los ácidos ribonucleicos a la arcilla, esto permitiría vislumbrar un posible panorama prebiótico para la síntesis de polipéptidos en ausencia de enzimas.

Por esta razón, nuestro objetivo fue realizar un estudio sistemático de la adsorción de adenina (purina) y uracilo (pirimidina) y sus correspondientes derivados de ribosa en montmorillonita de sodio.

Los objetivos particulares, fueron 1) determinar el o los sitios de pegado de las diferentes especies a la arcilla, mediante técnicas analíticas como son espectroscopía de ultravioleta, con la que se puede cuantificar el grado de adsorción; espectroscopía de infrarrojo y la difracción de rayos X, que contribuyen a la identificación del sitio de adsorción del compuesto químico a la arcilla. Asimismo y para poder discernir con mayor precisión el sitio de unión, 2) bloquear selectivamente a las arcillas, ya sea en el canal, con hexadecil-trimetilamonio (HDTMA), o en las orillas, con fosfatos, antes de llevar a cabo los estudios sobre adsorción.

De esta manera se espera tener un panorama mas claro sobre la interacción de los nucleótidos con las arcillas que permita, en trabajos posteriores, comprobar la factibilidad de un modelo matemático (Mosqueira, 1979) que propone que a partir de un polinucleótido adsorbido en una superficie como una arcilla, al cual se le unen por complementariedad pequeños oligonucleótidos con un aminoácido pegado, se puede lograr la síntesis de polipéptidos en ausencia de ribosomas y enzimas, por el aprovechamiento de las propiedades catalíticas de las arcillas.

CAPITULO II.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.1 MATERIALES

Todo el material de vidrio utilizado se lavó con una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico en caliente, posteriormente se enjuagó con agua destilada y finalmente se calentó en una mufla a 500 °C durante una noche.

La arcilla (montmorillonita de sodio SWy-1) se obtuvo de Crook County, Wyoming, E.U.A. Su capacidad de intercambio catiónico se determinó en el Instituto Mexicano del Petróleo y fue de 101 meq Na⁺/100 g de arcilla. Se esterilizó en una autoclave a 2 Kgf/cm² durante 20 minutos.

El agua bidestilada se desionizó en un sistema de agua ultrapura Milli-Q Plus Millipore y posteriormente se esterilizó en una autoclave a 2 Kgf/cm² durante 20 minutos.

La adenina, adenosina, AMP, ADP, ATP, poli A, uracilo, uridina, UMP, UDP, UTP, poli U, hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) y el polifosfato de sodio, fueron obtenidos de SIGMA, de la más alta calidad encontrada.

2.2 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE LAS BASES NUCLEOTIDICAS Y SUS CORRESPONDIENTES DERIVADOS DE RIBOSA.

Todas las soluciones se prepararon a partir de una solución de KOH 1 x 10⁻³ M, hecha con el agua bidestilada, desionizada y estéril, para facilitar la disolución de las bases.

Con base en la capacidad de intercambio catiónico determinada para la arcilla utilizada, y con el fin de no saturarla, se decidió trabajar a una concentración de 1 x 10⁻³ M para el caso de las

bases nucleotídicas (adenina y uracilo) y sus correspondientes nucleósidos y nucleótidos, y de $\sim 1 \times 10^{-5}$ M para sus correspondientes poliacidos, ajustando el pH a 2, 6 ó 10 con HCl o NaOH concentrados.

2.3 DETERMINACION DEL PICO MAXIMO DE ABSORBANCIA A pH 2, 6 Y 10 Y DEL COEFICIENTE DE EXTINCION MOLECULAR DE CADA UNO DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS A LOS pH MENCIONADOS.

Para cada compuesto, se preparó una "solución madre". De ésta, se tomaron alícuotas para preparar soluciones a 3 diferentes concentraciones: 1×10^{-3} M, 0.2×10^{-3} M y 1×10^{-4} M a cada uno de los tres pH, que se ajustaron con HCl concentrado o NaOH concentrada, en un potenciómetro LSX Sargent Welch.

Para determinar el pico máximo de absorbancia de cada compuesto, se hizo un barrido desde 300 hasta 200 nm de las soluciones a las tres concentraciones mencionadas a pH 2, como blanco se usó una solución de KOH 1×10^{-3} M ajustada a pH 2, mediante un graficador acoplado al espectrofotómetro Perkin Elmer 50S UV-Visible. Este mismo procedimiento se siguió para los otros dos valores de pH.

Una vez obtenida la absorbancia máxima promedio de las tres concentraciones para los diferentes pH, ésta se usó para determinar el coeficiente de extinción molecular (ϵ) de cada compuesto a cada pH, mediante la ecuación de Lambert y Beer, con ayuda del programa LOTUS. Este ϵ fue utilizado para calcular la cantidad de compuesto adsorbido a la montmorilonita, mediante la diferencia en absorbancia de cada compuesto en solución, con y sin arcillas (Figura 4a y 4b).

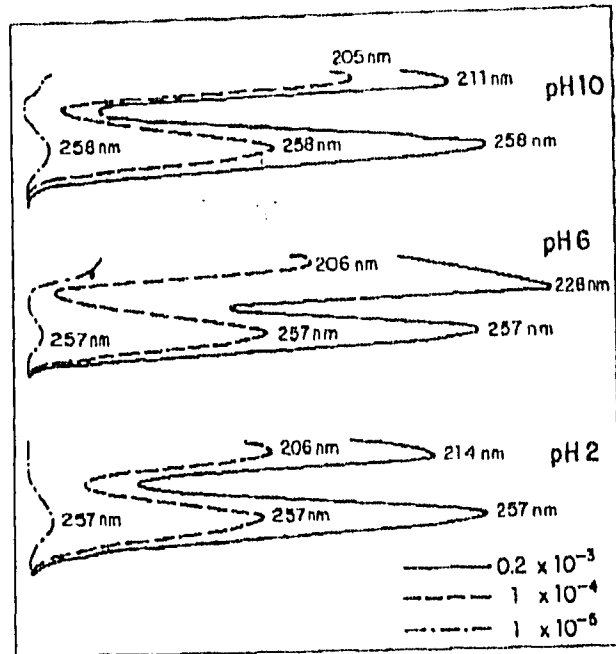


figura 4a Determinación del pico máximo de absorbancia para adenosina

Determinación del coeficiente de extinción molecular de adenosina a pH 2 a 257 nm.

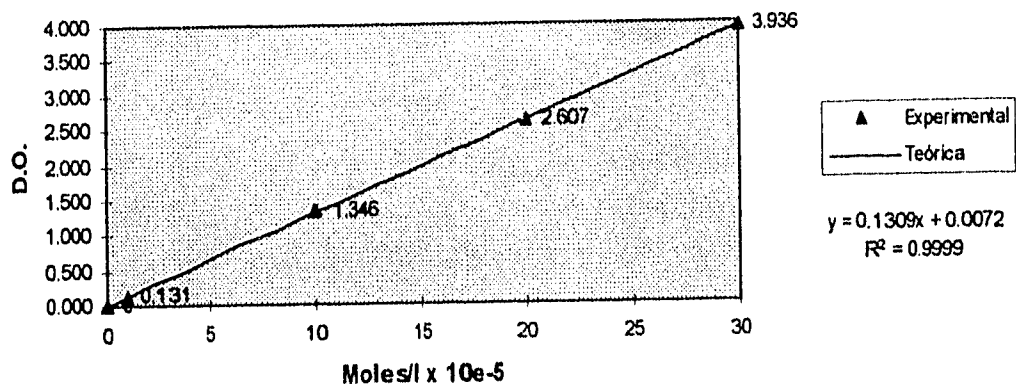


figura 4b. Gráficas experimental y teórica.

2.4 EXPERIMENTOS DE ADSORCION.

Se tomaron 3 ml de cada solución a los diferentes pH y se agregaron a 100 mg de arcilla este-

rilizada, se agitaron en un vortex durante aproximadamente un minuto para homogenizar la suspensión y se dejaron en agitación constante a 120 rpm durante 15, 30, 45 y 60 minutos. Algunas muestras se dejaron por períodos mayores de tiempo, pero aproximadamente a los 30 minutos, se llegó al valor máximo de adsorción y no cambió apreciablemente con el tiempo. Al cabo de cada uno de estos intervalos (15, 30, 45, 60 minutos), las muestras se centrifugaron a 40,000 rpm durante 30 minutos en una ultracentrifuga Beckman XL-90 en el rotor sw50.1, que nos fue facilitada en el Depto. de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El sobrenadante (diluido 1:4) se utilizó para calcular la cantidad de compuesto adsorbido a la arcilla mediante la diferencia en la absorción UV antes y después de agregar la montmorillonita. El precipitado se secó en una estufa a 60 °C durante una noche y se pulverizó para ser analizado posteriormente por rayos X y espectroscopía de infrarrojo (en ese orden). Todos los experimentos se hicieron, al menos, por duplicado.

2.5 EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON HDTMA.

Se prepararon soluciones de hexadeciltrimetilamonio en etanol, para tener 1 y 0.1 meq/meq de la capacidad de intercambio catiónico de la arcilla (Boyd et al., 1988). Estas soluciones se dejaron en agitación continua a 120 rpm durante 48 horas a temperatura ambiente, después se centrifugaron en la ultracentrifuga a 40,000 rpm durante media hora, el precipitado se secó en una estufa a 60 °C durante una noche y se analizó por difracción de rayos X.

Esta arcilla tratada, se mezcló durante media hora con soluciones de adenina, adenosina, AMP, uracilo y UMP 1×10^{-3} M y soluciones de poli A y poli U aproximadamente 1×10^{-5} M a pH 2, se centrifugaron y analizaron de la misma manera que las otras muestras.

2.6 EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN DE ADENINA Y POLI A EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON POLIFOSFATOS.

Se preparó una solución de polifosfato de sodio 0.01 M y 0.05 M y se mezcló con la arcilla

(Lyons, 1964), se centrifugó y secó y se mezcló con soluciones de adenina 1×10^{-3} M, se ajustó el pH a 2 y de poli A aproximadamente 1×10^{-5} M a pH 6 a diferentes tiempos, se centrifugaron y analizaron por espectroscopia de UV, de IR, y por difracción de rayos X, como las otras muestras.

2.7 MEDICION DE LA DISTANCIA INTERLAMINAR DE LA ARCILLA PARA CADA MUESTRA, POR DIFRACCION DE RAYOS X.

La arcilla seca obtenida después de cada experimento, se analizó en el difractómetro de rayos X Siemens D5000, de radiación filtrada $\text{CuK}\alpha$, en el Instituto de Geología, UNAM, para determinar si los compuestos bajo estudio estaban interaccionando en el canal interlaminar, para comparar el valor de esta medición en la arcilla natural, con el valor de la arcilla mezclada con los diferentes compuestos.

2.8 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.

Las muestras se analizaron primero por difracción de rayos X, y luego en el espectro de infrarrojo Perkin Elmer 783 en el Instituto de Geología, UNAM. Adicionalmente, se utilizó un espectro de infrarrojo Perkin Elmer 500FTIR en conexión con un accesorio de atenuación total de refracción (ATR), que permite hacer un análisis de infrarrojo únicamente en la superficie de la arcilla, y mediante el programa IRDM de Perkin Elmer se pudieron manipular los datos para amplificar las regiones de interés.

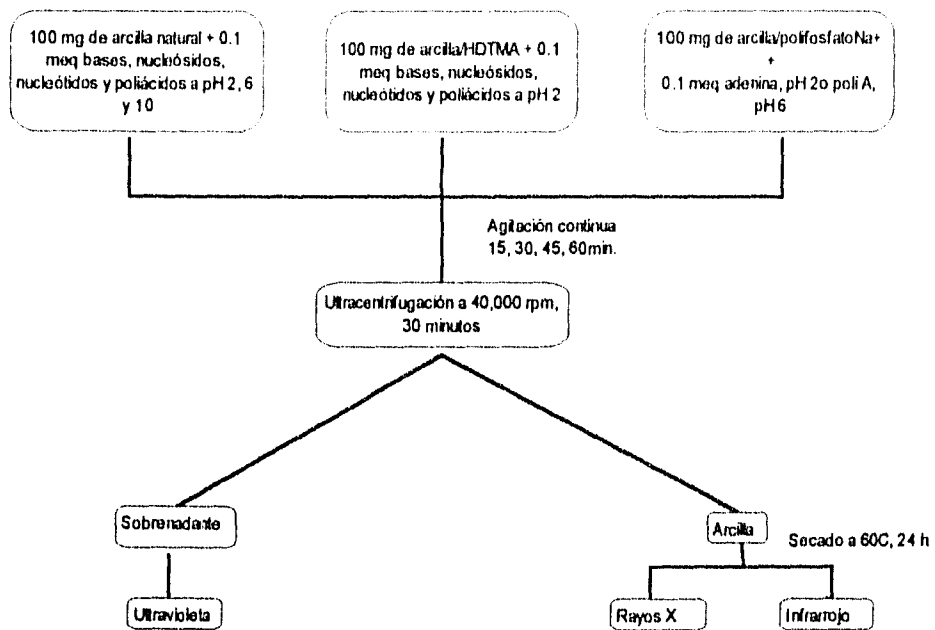


figura 5. Diagrama de flujo de los procedimientos experimentales.

3.1 EXPERIMENTOS DE ADSORCION

Con el fin de conocer el grado de adsorción de cada uno de los compuestos estudiados a la arcilla, se analizaron las diferentes muestras a los 3 pH y a los diferentes tiempos por espectroscopía de UV a la longitud de onda que se determinó para cada uno de los compuestos. Como se observa en la Tabla I, la mayor adsorción ocurrió a pH 2, por lo que los experimentos subsiguientes se realizaron a este pH. Asimismo, observamos que a los 15 minutos de interacción entre la arcilla y las especies estudiadas, se alcanzó un pico de adsorción que se mantuvo prácticamente constante hasta los 60 minutos (figura 6).

PURINAS Y SUS DERIVADOS

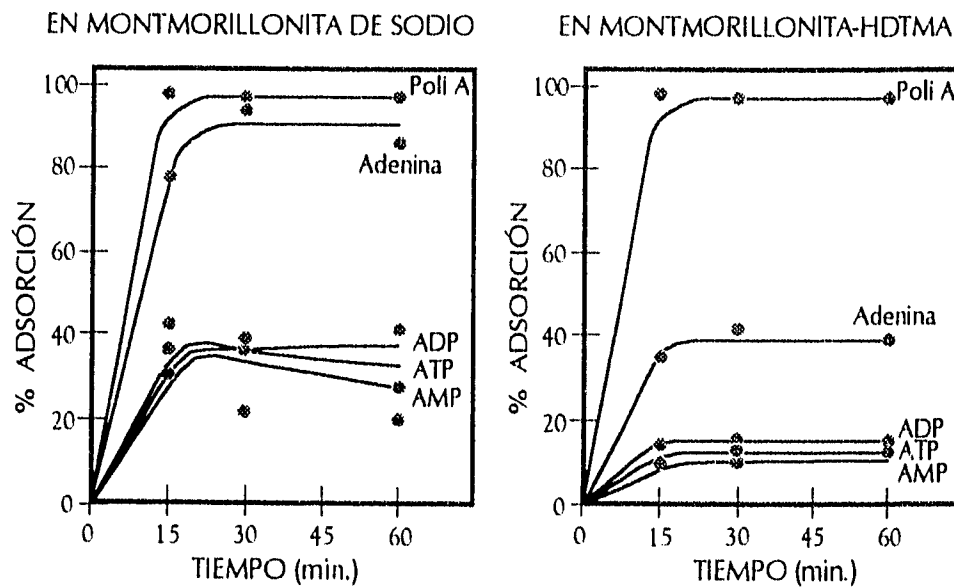


Fig. 5. Porcentajes de adsorción de Purinas en Arcilla Natural y en Arcilla tratada con HDTMA, a pH2.

TABLA I

Porcentaje promedio de adsorción de los compuestos estudiados a los tres valores de pH.

	pH 2	pH 6	pH 10
PURINAS			
Poli A	100	35	0
Adenina	98	4	0
AMP	30	0	0
Adenosina	25	10	0
ATP	8	0	0
ADP	2	0	0
PIRIMIDINAS			
Poly U	87	2	0
Uracilo	30	25	0
Uridina	23	3	0
UMP	10	2	0
UDP	2	0	0
UTP	0	0	0

3.2 EXPERIMENTOS DE ADSORCION EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON HDTMA.

El HDTMA es un compuesto anfipático con una cabeza polar y un esqueleto hidrofóbico de 16 carbonos, razón por la cual se adsorbe en el canal interlaminar. Los datos de difracción de rayos X muestran un ensanchamiento del espacio interlaminar en la arcilla tratada con HDTMA (14.28 y 15.44 Å) respecto a la arcilla sola (ver Tabla II). Este hecho, así como el análisis por espectroscopía de infrarrojo, nos dio la pauta para poder discernir el sitio de unión de los diferentes compuestos a la arcilla, así como el grado de adsorción de cada uno, a los diversos sitios en la arcilla (figura 6).

TABLA II.

Efecto del adsorbato sobre la distancia del espacio interlamilar de la Montmorilonita de sodio

Adsorbato	pH	Distancia basal (Å)*				
Arcilla natural	11.24					
HDTMA	2		14.28	15.44		
Fosfato (0.01M)	6	11.24				
Fosfato (0.05M)	6	11.11				
Adenina	2		12.26		15.21	
HDTMA + adenina	2			14.25	16.66	
Fosfato + adenina	2	11.74	12.53			
Poli A	2		12.72	13.18		
HDTMA + poli A	2			14.04		
Fosfato + poli A	2	11.16	11.68			
Adenosina	2	11.16	12.29	14.96		
HDTMA + adenosina	2			14.80	15.94	
AMP	2	11.58	12.28	14.08	16.27	
HDTMA + AMP	2			13.98	15.58	16.51
Uracilo	2		12.56			
HDTMA + uracilo	2	11.84	12.58	13.78		
UMP	2	11.22		13.01	14.32	
HDTMA + UMP	2			14.34	14.90	15.96
Poli U	2			14.09	15.81	
HDTMA + poli U	2			14.04	15.47	

* Distancias basales medidas por difracción de rayos X.

Así podemos ver que se observa siempre un pico alrededor de los 14 Å en los compuestos que se adsorbieron sobre la arcilla tratada con HDTMA, lo que indica un ensanchamiento del espacio interlamilar debido al HDTMA y también se registran otros picos debidos a la adición causada por los compuestos añadidos.

En la Tabla III , podemos ver que las bases nucleotídicas y sus correspondientes nucleósidos,

se adsorben principalmente en el canal interlamilar, aunque también hay una fracción que se adsorbe en la superficie; los nucleótidos se adsorben en general poco, pero sobre todo en el canal interlamilar; y en el caso de los poliácidos, éstos se encuentran adsorbidos casi en un 100% en la superficie de la arcilla. Cabe aclarar que en el caso de los nucleótidos, las diferencias en adsorción entre ellos, son muy pequeñas y la dispersión de los datos es grande.

TABLA III.

Porcentaje de adsorción de las bases nucleotídicas y sus derivados en los diferentes sitios de la arcilla a pH 2.

Compuesto	Adsorción en el canal	Adsorción en otros sitios	Adsorción total
Adenina	60	40	98
Adenosina	72	28	25
AMP	68	30	30
ADP	56	44	5
ATP	70	30	10
Poli A	9	91	100
Uracilo	80	20	30
Uridina			23
UMP			10
UDP			2
UTP			0
Poli U	25	7.5	87

3.3 EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN DE ADENINA Y POLI A EN PRESENCIA DE ARCILLA TRATADA CON POLIFOSFATOS.

Para cuantificar el grado de adsorción de las bases, nucleótidos y poliácidos en la superficie de la arcilla, se trató a ésta con una solución de polifosfato de sodio 0.01 M y 0.05 M y luego se mezcló con la solución de adenina $1 \times 10^{-3}M$ pH 2 y con poli A $1 \times 10^{-5}M$ a pH 6.

Con estos experimentos, así como con los de la arcilla tratada con HDTMA, pudimos discernir el

sitio de unión de los compuestos a la superficie de la montmorilonita. Algunos de estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla II, en donde puede verse que la arcilla tratada con fosfatos desarrolla una distancia basal igual a la de la arcilla natural, lo que indica que éstos no entran al canal, simplemente debido a una repulsión de cargas. Lo mismo sucede cuando además se agrega adenina o poli A, aunque en estos casos se observan unos picos adicionales que corresponden a los que desarrollan cada una de estas moléculas con la arcilla no tratada.

3.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.

Mediante el análisis de los espectros de infrarrojo y con el accesorio ATR, que analiza a los compuestos en su superficie, se observó que la vibración de alargamiento en 3625 cm^{-1} que corresponde al Si-OH de las capas tetraédricas, no cambió de frecuencia, forma o intensidad con ninguno de los compuestos estudiados. En contraste, la banda que corresponde a los OH superficiales en 3460 cm^{-1} , apareció siempre en la misma frecuencia, pero más ensanchada y con intensidades variables en los diferentes sistemas con respecto a la arcilla natural. Este ensanchamiento es debido al alargamiento del grupo N-H de las bases en $3415\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$ y al OH asociado a la ribosa en los nucleósidos, nucleótidos y polímeros.

Otra banda importante que mostró cambios con el proceso de adsorción, es la vibración fuera del plano del grupo Si-O en 1045 cm^{-1} que presentó corrimientos de $5\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ con algunos compuestos, más no con adenina o adenosina. Por otro lado, la banda que corresponde al grupo fosfato en $1740\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (Bellamy, 1975), así como la banda del grupo HOH de la arcilla, presentaron un ensanchamiento, un corrimiento a frecuencias más altas y una menor intensidad, en comparación con el espectro de la arcilla sola. Otras bandas que se asocian a la vibración de alargamiento de P-O en 1231 cm^{-1} y la de P=O en 1375 cm^{-1} , confirmaron la adsorción de los compuestos fosfatados en la superficie de la arcilla. Este dato se apoya también en los estudios que se realizaron envenenando a la arcilla con polifosfato de sodio (es decir, saturándola con la solución de fosfatos previo a su tratamiento con algunos de los compuestos estudiados), en los que resultados preliminares demuestran un decremento en la adsorción de los polímeros en relación a la adsorción en la arcilla natural. Con la técnica de ATR, la vibración Si-OH desaparece o es muy débil (Tabla IV).

TABLA IV

Bandas principales de infrarrojo de los complejos arcilla - compuesto orgánico

Complejo	Frecuencia (en cm^{-1})				
Montmorilonita de sodio	1,118	1,168	916	881	840
Montmorilonita - HDTMA	1,118	1,168	916	884	850
Montmorilonita - fosfatos	1,148	1,165	918	881	850
Montmorilonita - adenina	1,123	1,168	918	887	853
Montmorilonita - HDTMA - adenina	1,125	1,175	918	881	846
Montmorilonita - fosfatos - adenina	1,138		992	877	848
Montmorilonita - uracilo	1,126	1,170	919	881	849
Montmorilonita - HDTMA - uracilo	1,120	1,168	917	888	849
Montmorilonita - adenosina	1,118		918	890	840
Montmorilonita - AMP	1,118	1,175	918	887	
Montmorilonita - HDTMA - AMP	1,118	1,175	918	881	
Montmorilonita - ADP	1,118	1,168	918	887	849
Montmorilonita - HDTMA - ADP	1,118	1,175	918	893	850
Montmorilonita - ATP	1,120	1,181	918	881	
Montmorilonita - HDTMA - ATP	1,125	1,175	918	881	
Montmorilonita - UMP	1,120	1,168	920	870	840
Montmorilonita - UTP	1,112	1,168	918	887	849
Montmorilonita - poli A	1,123	1,169	917	882	848
Montmorilonita - HDTMA - poli A	1,122	1,167	918	887	848
Montmorilonita - fosfatos- poli A	1,120	1,171	915	881	847

CAPITULO IV

DISCUSION DE RESULTADOS

Actualmente existe una gran cantidad de trabajos experimentales sobre la síntesis abiótica de biomoléculas bajo diferentes condiciones tanto atmosféricas, como de fuentes energéticas y de precursores; sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin respuesta, entre ellas, los mecanismos bajo los cuales se pudieron formar los diferentes biopolímeros a partir de los monómeros que los constituyen.

Como ya se mencionó en la introducción, Bernal fue el primero en 1951, en proponer que las arcillas pudieron haber tenido un papel importante en la química prebiótica, debido a su aparición temprana en la Tierra, amplia distribución, capacidad catalítica, y como agentes concentrantes, lo que pudo contribuir en la auto - organización de los biomonomeros, mediante su adsorción en la superficie del mineral, para formar sus correspondientes polímeros.

A principios de los 1970, se publicaron varios trabajos en los que se usaba a las arcillas como catalizadores para la síntesis abiótica de los biomonomeros (Yoshino *et al.*, 1971; Poncelet *et al.*, 1975). Unos años antes, el grupo de Lailach (1968 a y b; 1969) publicó sus resultados sobre la adsorción de purinas, pirimidinas y sus nucleósidos, en minerales arcillosos. Estos últimos trabajos, se pueden considerar como el punto de partida de una serie de investigaciones conducentes a dilucidar los mecanismos de la interacción entre diferentes biomoléculas (aminoácidos, péptidos, proteínas, bases nucleotídicas, nucleósidos, nucleótidos, oligonucleótidos y ácidos grasos) con las arcillas.

En todas estas investigaciones, el tipo de mineral arcilloso y las condiciones experimentales utilizadas son muy diversas, lo que dificulta la comparación de resultados y por lo tanto, la posibilidad de llegar a alguna conclusión. Sin embargo, se han logrado entender algunos de los mecanismos que promueven la adsorción tanto de los aminoácidos como de las bases nucleotídicas, a las arcillas. Estos se encuentran resumidos en la revisión de Ponnampuruma *et al.*, 1982 y que a continuación se enumeran:

1. La adsorción es dependiente del pH, y es el intercambio catiónico el mecanismo más importante a pH bajos.
2. La transferencia de protones juega también un papel importante a pH ácidos y neutros.
3. La adsorción de bases nucleotídicas a pH altos, puede llevarse a cabo a través de las interacciones de aquéllas con metales inorgánicos o de transición en la superficie de la arcilla. Para esto, es importante considerar el carácter aromático de las bases, que puede promover asociaciones selectivas por medio de estructuras de resonancia con los cationes.
4. La forma y tamaño de las moléculas es determinante para la cantidad de adsorción: con moléculas grandes, las fuerzas de van der Waals serán mayores, y por tanto, también la adsorción, pero también puede inhibirse debido a causas estéricas.
5. El grado de adsorción de una molécula depende del pKa del compuesto, del pH de la solución, y del catión inorgánico presente en la arcilla.
6. Las purinas se adsorben en mayor grado que las pirimidinas; a esto se le ha atribuido que, por ser más grandes las purinas, las fuerzas de van der Waals son mayores y hay más adsorción. Además, los nucleósidos y nucleótidos se adsorben menos que las bases nucleotídicas, porque al ser éstas últimas planares, se pueden intercalar en el espacio interlaminaar.

En lo que se refiere a la adsorción de nucleótidos, Graf y Lagaly en 1980, publicaron que el AMP se adsorbía menos que el ATP, en varios tipos de arcillas y silicatos, mientras que Odom *et al.* (1979) mostraron que el ADP se adsorbía más que el AMP en bentonitas y caolinitas de sodio, calcio y magnesio.

También en 1980, Lahav y White propusieron que las arcillas podrían servir en la producción de oligómeros en condiciones prebióticas o como moldes para la duplicación de ácidos nucleicos, con la ayuda tal vez, de un péptido catalítico.

En 1988, Femis y su grupo presentan evidencias experimentales sobre la adsorción de homopolímeros de RNA en montmorillonita de sodio y la unión de mononucleótidos a éstos, por puentes de hidrógeno tipo Watson - Crick, en presencia del amortiguador PIPES, para mantener el pH constante. Al año siguiente, publicaron otro trabajo en el que presentan la dimeriza-

ción de 5'-AMP en presencia de arcillas y de carbodiimida, como agente condensante. Como se mencionó en la introducción, los trabajos de Ferris con arcillas son numerosos, pero a diferencia del presente estudio, en muchos casos utilizan arcillas que no se encuentran naturalmente, como las montmorilonitas de zinc (Ferris y Hagan, 1986) o de cobre (Ferris *et al.*, 1989a), y amortiguadores que difícilmente pudieron haber estado presentes en la Tierra primitiva.

Con el fin de tener condiciones experimentales que se acercaran más al tipo de ambiente y condiciones existentes en la Tierra primitiva, se decidió a) trabajar con montmorilonita de sodio, porque el sodio es el catión intercambiable más abundante en las arcillas contemporáneas (Grim y Güven, 1978), y seguramente también en las arcillas primitivas; b) trabajar en ausencia de cualquier amortiguador; y c) usar tres valores de pH: 2, 6 y 10, para tener datos reproducibles que permitan hacer comparaciones con otros trabajos similares e inferencias sobre el tipo de Interacciones que se llevan a cabo entre las arcillas y las bases nucleotídicas y sus derivados.

A partir de nuestros datos, nosotros observamos al igual que otros autores (Lailach *et al.*, 1968 a y b; Lailach y Brindley, 1969; Odom *et al.*, 1979; Lahav y White, 1980), 1) que la adsorción depende del pKa del compuesto orgánico y de su estructura, así como del pH de la solución; 2) que las purinas se adsorben más que las pirimidinas; 3) que a pH ácidos la adsorción es mayor que a pH neutros o alcalinos; 4) que el intercambio iónico es el mecanismo principal en la adsorción, aunque las fuerzas de van der Waals son muy significativas, sobre todo en compuestos planares grandes.

Como ya se mencionó, la mayor adsorción para todos los compuestos fue a pH 2. Sin embargo, las diferencias en adsorción entre ellos no puede ser atribuida al pKa, ya que como se ve en el apéndice 1, todos tienen pKa muy similares y a pH 2 se encuentran protonados; las fuerzas de van der Waals, la unión por medio de los grupos fosfato, o por el enlace de hidrógeno, podrían ser una explicación a este fenómeno. Es importante considerar que, sobre todo en la adsorción que se lleva a cabo en el canal, el tamaño y la geometría de la molécula, son determinantes.

Es factible pensar que los compuestos fosfatados se unen a la arcilla en dos sitios: en las orillas positivas del cristal, mediante los grupos fosfato, y en el canal, por medio de los grupos N-H de las bases nitrogenadas.

La idea de Oparin y Haldane de que la vida se había originado a partir de la gran sopa primitiva y a un pH neutro o cercano a la neutralidad, se ha ido transformando sobre todo con experimentos para la síntesis de compuestos a partir de ciclos de hidratación-deshidratación de pequeños cuerpos de agua (Lahav y White, 1980) y con los datos que existen sobre las condiciones extremas de pH y temperatura que imperan en las troneras submarinas (Seeger et al., 1993). En este sentido, nuestros resultados pueden apoyar la idea de que la vida probablemente se originó en microambientes en los que existía un pH ácido.

Finalmente, este trabajo puede servir de base para comprobar la factibilidad de un modelo matemático para la síntesis de polipéptidos en condiciones prebióticas (Mosqueira, 1979), en el que se propone que las arcillas pudieran servir como molde para la adsorción de un polímero de RNA, al cual se le pegarían por complementaridad de bases, pequeños oligonucleótidos asociados a los aminoácidos. Así, conociendo el sitio de adsorción y la forma como se unen los polímeros a la arcilla, se podría evaluar la posibilidad de una síntesis de polipéptidos molde-dirigida.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

El objetivo principal del presente trabajo, fue el de realizar un estudio sistemático sobre la adsorción de la adenina (purina) y de uracilo (pirimidina) con sus correspondientes nucleósidos, nucleótidos y poliacidos en montmorillonita de sodio a 3 valores de pH, y bajo condiciones experimentales que asemejaran un ambiente prebiótico. Esto, con el propósito de poder identificar el tipo y el sitio de las interacciones que se llevan a cabo entre ambos componentes, como un primer paso necesario para entender cómo pudo haber surgido la síntesis de polipéptidos a partir del mundo del RNA.

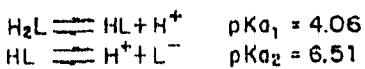
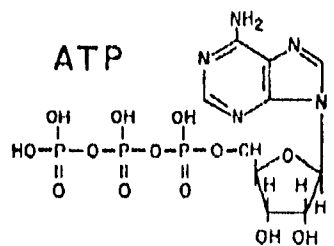
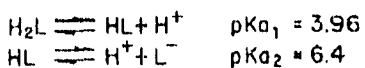
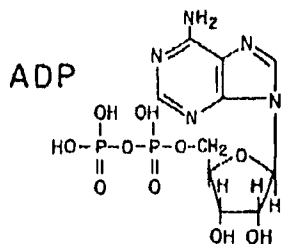
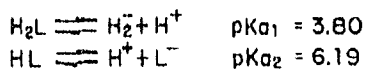
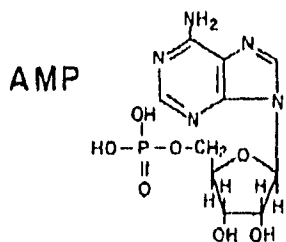
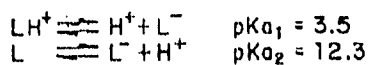
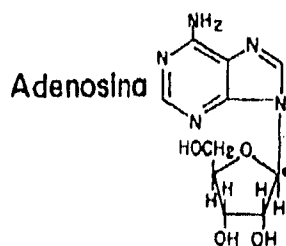
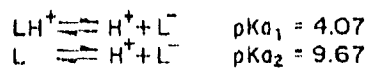
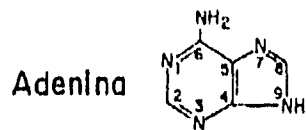
Las principales conclusiones que se derivaron de este estudio son las siguientes:

1. Las purinas se adsorben más que las pirimidinas.
2. La adsorción es mayor a pH ácidos.
3. La fuerza iónica y el pH de la solución, el tamaño, la forma y el pKa de las moléculas, son determinantes en el grado de adsorción a la arcilla.
4. A pH 2, y de acuerdo a los valores de pKa de las moléculas, todas se encuentran protonadas, por lo que pueden pegarse a la arcilla (que también está protonada a ese pH) mediante diversos mecanismos, como son por fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno o por medio de los grupos fosfato, en el caso de los nucleótidos y los poliacidos.
5. A pH 6, la mayoría de las especies están neutras o cargadas negativamente y se pegan muy poco o no se pegan al canal, que se encuentra cargado negativamente. Sin embargo, es posible que algunos de los compuestos se peguen en las orillas de la arcilla, que presenta una carga positiva.
6. A pH 10, todas las especies tienen una carga negativa y por ende, no se pegan al canal ni en la orilla.
7. En general para todas las especies estudiadas, en el canal se obtuvo el mayor grado de adsorción, aún cuyo éste fue bajo, con excepción de la adenina, adenosina, uracilo y uridina. Los polímeros se pegan básicamente en las orillas del cristal.
8. A pH 2, el orden de adsorción para las purinas, fue el siguiente: adenina = poli A > adeno-

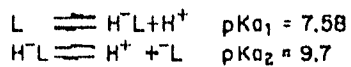
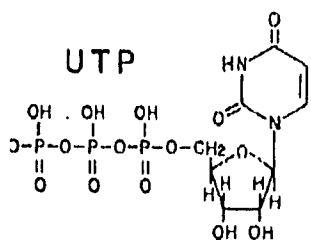
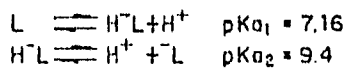
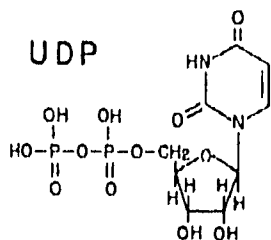
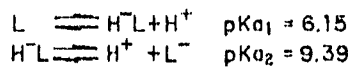
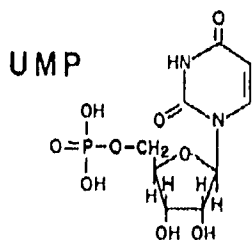
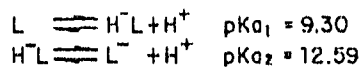
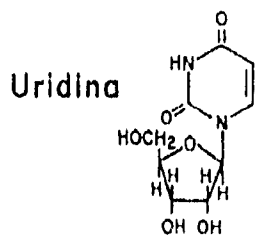
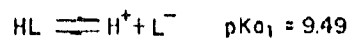
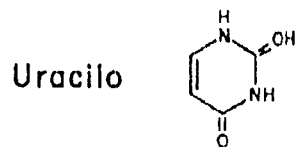
sina > AMP > ATP > ADP. En el caso de las pirimidinas, el orden de adsorción fue el mismo que con las purinas, con la excepción del UTP que no se adsorbió nada.

APÉNDICE 1

**Estructuras químicas y valores de pKa de algunos de los
compuestos estudiados**



TTo



Tomado de Smith y Martell (1989)

APÉNDICE 2

**Artículo enviado para ser publicado en la revista
*Origins of Life***

SITE OF ADSORPTION OF PURINES, PYRIMIDINES AND ITS
CORRESPONDING DERIVATIVES ON SODIUM MONTMORILLONITE.

Lucía Perezgasga^a, Alicia Negrón-Mendoza¹

¹ Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM. Cd. Universitaria, A.P.
70-543, México 04510, D.F.

& Present address: Depto. de Fisiología y Genética Molecular
Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Chamilpa #2001 A.P.510-3
Cuernavaca, Mor. 62271, México.

Liberto De Pablo-Galán²

²Instituto de Geología, UNAM. Cd. Universitaria, A.P.
México 04510, D.F.

F. Guillermo Mosqueira^{3,a}

³ Centro Universitario de Comunicación de la Ciencia, UNAM. Cd.
Universitaria, A.P. 70-487, México 04510, D.F.

Abstract. Clay minerals are considered necessary to the process of chemical evolution due to their properties, ancient origin and wide distribution. To extend the knowledge of their role in prebiotic times, the adsorption sites of adenine, adenosine, AMP, ADP, ATP, Poly A, uracil, uridine, UMP, UDP, UTP and Poly U on sodium montmorillonite are evaluated. X-ray diffraction, ultraviolet and infrared spectroscopy studies indicate that some of these molecules enter into the interlamellar space while others are attracted to the edge of the clay crystals. Monomers are adsorbed essentially in the interlamellar space, whereas polymers prefer adsorption along the crystal edges. Such behavior is discussed in terms of local pH and pKa of the adsorbate, as well as from the standpoint of van der Waals interactions.

1. Introduction

The relevance of mineral surfaces in understanding the origin of life was discussed by Bernal (1951) and Cairn-Smith (1966). Several studies were published on the relationships between prebiotic molecules and clay surfaces (Rao et al., 1980). Special attention was given to the adsorption of nucleic acid bases and their corresponding derivatives on mineral surfaces, particularly on montmorillonite, measuring adsorption and the influence of pH, other molecules, the ionic strength, degree of polymerization, and other variables. These studies showed the extension of the adsorption process under different conditions, without going into the details on the sites of adsorption or the orientation of the adsorbate molecules on the clay surface.

^aTo whom correspondance should be addressed.

The present work attempts to establish the specific adsorption site of purines, pyrimidines and their corresponding derivatives on Na-montmorillonite, by selectively blocking available sites on the edges or the interlamellar space of the clay crystal with other molecules.

2. Experimental

The montmorillonite used as a substrate to anchor the organic molecules was Na-montmorillonite from Crook County, Wyoming U.S.A, clay mineral standard SWY-1. The clay was sterilized by autoclaving at 2 kgf/cm² pressure for 20 minutes. Its cation exchange capacity was 101 meq Na⁺/100 g. Nucleotide bases and its corresponding ribose derivatives, sodium polyphosphate, and hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HDTMA) were reactant grade, from Sigma Chemicals. Water was deionized in a Milli-Q Plus Millipore Ultra Pure Water System, and sterilized by autoclaving at 2 kgf/cm² for 20 minutes. KOH 10⁻¹ M was used in the preparation of the nucleotide solutions. The glassware was washed with a hot mixture of sulphuric and nitric acids, rinsed thoroughly and laid overnight in the oven.

The fraction of organic molecules adsorbed on the clay surface was calculated from the extinction coefficients (ϵ), determined by measuring the wavelength in the ultraviolet region for maximum absorbance at pHs of 2, 6 and 10, using a Perkin-Elmer spectrometer, in the range from 200 to 300 nm. pHs were measured with a LSX Sargent-Welch pH meter. A Beckman XL-90 ultracentrifuge in a sw 50.1 bucket-rotor was used to separate the fine-particle solids from the liquid phases.

Changes in the interlamellar space of montmorillonite resulting from intercalation of the adsorbed molecules were recorded by X-ray diffraction spectroscopy measuring the (001) reflection of the clay. A D5000 Siemens diffractometer was used, with filtered CuK α radiation, at 2 θ angles from 2 to 15°, on fine-powder oriented specimens. Infrared spectrometry served to characterize hydration in the clay, the adsorbed organic molecule and the site of adsorption, using a Perkin-Elmer double beam spectrometer operated at a scanning speed of 1000 cm⁻¹/min from 4000 to 2000 cm⁻¹ and at 500 cm⁻¹/min between 2000 and 200 cm⁻¹, and a Perkin-Elmer 50 Fourier spectrometer with attenuated total reflection and IRDM software.

1. *Sample preparation and Adsorption on Montmorillonite.*

Nucleotide solutions 1×10^{-3} M and polynucleotide solutions 2×10^{-6} M were prepared adjusting pH at 2, 6, and 10. Three ml of each solution were added to 100 mg of sterilized clay, vortexed to facilitate solution and left in constant agitation for periods of 15, 30, 45, or 60 minutes. The mixture was centrifuged afterwards for 25 minutes and the supernatant liquid diluted to a 1:4 ratio for UV spectral measurements. The amount of nucleotide adsorption to montmorillonite was calculated from the difference in the UV absorption before and after adding montmorillonite. The experiments were run in duplicate all cases. The solids sedimented after centrifugation were dried at 60°C 24 h, prior their characterization by X-ray diffraction. For the IR analysis, 2 mg of reacted clay were mixed with 100 mg of dried KBr and pressed into discs.

2. *Interaction of Nucleotides and Polynucleotides with HDTMA-Treated Clays.*

Na-montmorillonite was dispersed in solutions of HDTMA in ethanol to have cation exchange capacities of 1 and 0.1 meq of the clay (Boyd et al., 1988). The mixture was shaken 48 h at 25°C , centrifuged, and the solid fraction dried at 60°C 24 h. This clay was subsequently used with some of the adsorbates to estimate the extent of adsorption within the blocked interlamellar space of the clay. The analysis was performed as indicated previously.

3. *Interaction of Adenine and Poly A with Polyphosphate-Treated Clays.*

Solutions of sodium polyphosphate (0.01 and 0.05 M) were added to the clay as per known techniques (Lyons, 1964; Muljadi et al., 1966). The phosphate-reacted montmorillonite was subsequently mixed with adenine (1×10^{-3} M) or poly A ($\sim 2 \times 10^{-6}$ M), reacting for various periods of time and centrifuging the solids afterwards.

3. Results and Discussion

a. X-ray diffraction studies.

The unreacted partially dried Na-montmorillonite is characterized by a low-intense broad peak that extends from 9.65 to 13.20 Å, with

low-intensity reflections at 11.24 and 11.63 Å and a second less intense reflection at 24.27 Å. HDTMA adsorbed on the clay moves the basal reflection to 14.28 Å, with weak reflections at 15.44 and 17.30 Å. Considerations of the dimensions of the HDTMA molecule suggests that it is most possibly oriented parallel or inclined to the interlamellar space. Na- montmorillonite reacted with 0.01 M and 0.05 M phosphate solutions did not show any displacement of the basal distances of 11.37 and 11.11 Å that characterize the unreacted clay, confirming that the phosphate molecule does not enter into the negatively charged interlamellar space. Weak reflections at 27 and 29 Å coincide with those of the original untreated clay.

Adenine displaces the basal space to 12.26 Å, with weak reflections at 15.21 and 27.82 Å, indicating that adenine is adsorbed in the interlamellar space of the clay with parallel orientation as would be expected from the size and planar form of the adenine molecule. Addition of adenine on top of HDTMA further expands to 16.66 Å the basal reflection, meaning that some adenine molecules are kept in the free sites left by the HDTMA molecules. Addition of adenine on top of phosphates develops the same basal space as adenine alone (Table I).

Uracil added to Na-montmorillonite, or added on top of HDTMA or of phosphate expands the (001) basal clay space to 12.56 Å, suggesting that different orientations can be adopted. Purine and pyrimidine nucleotides (AMP, ADP, ATP, UMP, UDP and UTP) displace the basal space from 12.5 to 13.5 Å (Table I). Poly A shifts the space to 12.72 and 13.18 Å, with a low intensity peak at 20.82 Å, and to 14.04 Å with HDTMA and minor peaks at 20.53, 23.19 and 27.66 Å. Poly U displaces the basal spacing to 11.84 and 12.58 Å with minor low intensity peaks at 16.72 and 20.5 Å, and to 14.04 and minor peaks at 15.47, 17.04 and 20.5 Å when added on top of HDTMA; additional phosphates do not move the basal space.

The X-ray data confirms that some molecules enter into the interlamellar space of montmorillonite but some other molecules, particularly the polymers, are not capable of penetrating the space, possibly because of their bulky size, and are adsorbed on the external surface of the clay crystal. This is confirmed by IR data, which shows shifting and increase intensity of the O-Al-O absorption band at 1124 cm⁻¹ when phosphate-bearing compounds interact with the Al³⁺ at the lateral surface of the clay crystal. Reflections at ~12 Å in the diffraction patterns of poly A and poly U could be caused by contaminations of their respective nucleotide bases. The peaks observed at ~20 Å are water molecules, or ethanol molecules in the HDTMA-treated clay.

TABLE I. Effect of adsorbates on the basal space of Na-montmorillonite.

b. Infrared spectra.

The characteristic OH stretching absorptions at 3625 cm^{-1} and 3460 cm^{-1} are assigned to Si-OH stretching vibration and to adsorbed water. This is supported by spectra obtained using the ATR accessory for the FTIR, which suppresses the latter band. The low-frequency is broad in the reacted clays, more than it is in the untreated montmorillonite, extending from $3415\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$, due to the N-H stretching from the base and to the oxhydriles associated with the sugar moiety in nucleosides, nucleotides and polymers. In some spectra are noted as small shoulders. Other bands assigned to the purine/pyrimidine moiety like the 1604 cm^{-1} bending vibration of the NH_2 group, and the 1532 cm^{-1} absorption of the imidazole ring were not observed in the clay-organic complexes. Two small bands at 2704 and 2688 cm^{-1} were assigned to Al(Mg)-OH and Al-OH. Water bending at a frequency of 1630 cm^{-1} showed in all reacted clays. The bands at 920 , 880 , and 840 cm^{-1} assigned to OH associated with Al, Fe^{+3} and Mg^{+2} were quite small (Russell et al., 1970, Russell and Fraser, 1971 and Heller-Kallai, 1975), and increased in intensity with adsorption of some molecules. These bands appeared in the spectra taken with the ATR accessory and showed small modifications due to the adsorbate.

The Si-O out-of-plane vibration centered at 1045 cm^{-1} was narrowed and shifted by 5 to 10 cm^{-1} with various adsorbates. Adenine and adenosine did not displaced the Si-O vibration, but compounds that have phosphate groups did and new bands appeared. The absorption centered at $1740\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ stems from phosphate stretching vibrations (Bellamy, 1975). This band and the HOH band at 1640 cm^{-1} appeared broader, less intense and shifted to higher frequencies. The band at 1231 cm^{-1} , though of low intensity, confirms the P-O stretching. At 1375 cm^{-1} appeared the P=O band. These bands showed that the adsorbate interacts with the clay surface. Increasing concentrations of the bases does not affect the IR pattern.

The IR spectra show that bases, nucleosides and nucleotides are adsorbed essentially in the interlamellar space of montmorillonite, while poly A and poly U are adsorbed on the edges of the clay crystal, where Al^{+3} interacts with the phosphate groups of these molecules. Because there is local deficiency of charges, Al(Mg)-OH groups can be negatively charged and interact with protonated adenine at the crystal edges. Some of the infrared bands of several studied compounds are shown in Table II.

TABLE II. Principal IR bands of the clay - organic compounds complexes.

c. Adsorption Experiments.

The adsorption data of adenine and its derivatives, as prototype of purines, and uracil and its derivatives, for the pyrimidines, are indicated in figure 1. Pyrimidines were adsorbed to a lesser extent than the purines.

Three pHs were used in the adsorption studies. At pH 2, a 1×10^{-3} M solution of adenine is 93% adsorbed; at pH 6 the adsorption decreases to 38% and at pH 10 decreases to 26%. For poly A, the same trend is observed and the mean adsorption changes abruptly from 99% at pH 2 to 5% at pH 6 and 0% adsorption at pH 10. Pyrimidines behave similarly, adsorbed to a lesser extent. Uracil is adsorbed about 30% at pH 2, 14% at pH 6 and is not adsorbed at higher pH values. Poly U is adsorbed 40% at pH 2, 2% at pH 6 and null at pH 10.

Fig. 1. Percent adsorption of purines and their derivatives on Na-montmorillonite and on Na-montmorillonite/HDTMA, at pH 2.

The adsorption trend is explained in terms of pH and pKa. As the pH of the system changes, the relative proportions of the ionic species of the adsorbate molecule also changed according to their pKa. This is possibly because the molecules adsorbed have a net positive charge at pH 2, where the main adsorption mechanism is one of ionic interchange, although other mechanisms may contribute as well.

d. Adsorption experiments in the presence of HDTMA.

Cation exchange occurs when n-primary aliphatic amines, like HDTMA, react with Na-montmorillonite. The salt form of the organic base may be regarded as a substituted ammonium salt that changes the hydrophilic nature of clay to organophilic.

When the HDTMA-clay is mixed with a solution of the bases, nucleosides and nucleotides, the adsorption decreases relative to the unreacted clay (Table III and Figure 1). The adsorption of poly acids on HDTMA-montmorillonite is slightly less than on the unreacted clay (Table III and Figure 1).

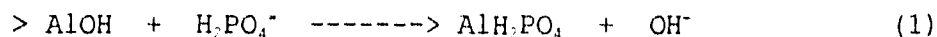
Lagaly and Weiss (1969) were able to correlate charge density, length of the alkyl chain in the amine and swelling in water. In the present case, montmorillonite with a layer charge of 0.33

swells in water only if the chain is larger than eight carbon atoms. This swelling causes that the alkylammonium ions in the interlamellar channel block active groups from the clay, hindering adsorption of bases and nucleotides. When the active sites are occupied by HDTMA, only part of the adenine is adsorbed, at the edges or in the interlamellar channel. If less alkyl ammonium salt is used and free active sites are left, more adenine is adsorbed. A similar behaviour is observed for nucleosides and nucleotides.

TABLE III. Adsorption of nucleic acid bases and their derivatives on clays at pH 2.

e. Adsorption experiments in the presence of phosphates.

Polyacids are bonded to the edges of the clay and sides of the montmorillonite crystal, through phosphate groups. The hypothesis, was tested on phosphate-treated clay. The adsorption of phosphate ions has been associated with the crystal edges (Muljadi et al., 1966; Lyons, 1964). It has been suggested that the exchange of the phosphate ions with OH⁻ on the >AlOH edge is the simplest mechanism for phosphate adsorption (Muljadi et al., 1966), which may be represented by equation 1:



Polyphosphate poisoned Na-montmorillonite adsorbs at pH 2 less adenine (57%) than unreacted clay (93%). It confirms with the adsorption on HDTMA-clay experiment, in which about 40% of adenine remains bonded to the clay, but not in the active sites of the interlamellar space. Preliminary results indicate that in poly A the adsorption changes from 5 % to 0% at pH 6

A group of reactions was carried out in the normal manner with the exception that montmorillonite was poisoned with polyphosphate. Na-montmorillonite poisoned with polyphosphate adsorbs at pH 2 less adenine (57%) than unreacted clay (93%). The result agrees with the adsorption in the HDTMA-clay experiment in which about 40 % of adenine was still bonded to the clay, but not in the active sites of the interlamellar channel. Preliminary results showed that in poly A adsorbed on phosphate-montmorillonite, the adsorption changed from 5% to 0% at pH 6. The data confirm that poisoning on the edges of clay crystal decreases the adsorption of polyacids and monomers. In consequence, there appears to be extensive involvement of crystalline edges, in addition to the active sites from the interlamellar space.

4. Conclusions

Clay minerals were formed abundantly in early geological times (Reynolds Jr., 1988) and have a wide distribution. They have been considered of importance to chemical evolution, because of their catalytic properties and the adsorptive surfaces that present to the organic molecules relevant in prebiotic chemistry. Many experiments sustain these qualities, in which the conditions used are diverse, and in some cases they do not reflect the probable environment present in the primitive Earth.

The adsorption of nucleotide bases and its corresponding derivatives on Na-montmorillonite were studied at three different pH values. The data obtained coincides with other authors (Lailach et.al., 1968 a, b; Lailach and Brindley, 1969; Odom et.al., 1979; Lahav and White, 1980). Purines adsorb more extensively on montmorillonite than pyrimidines. The maximum adsorption occurs at acidic pHs. It is known that the ionic force of the solution, the size, shape and pKa of the molecules, among other factors, are important in determining the degree of adsorption on the clay. Nevertheless, at pH 2 where species are protonated, the pKa cannot be taken into consideration to explain differences in the adsorption. At pH 6, most of the species are neutral or negatively charged and are not adsorbed into the negatively charged interlamellar space. At pH 10, the species are negatively charged and not adsorbed.

Most of the species studied are adsorbed on the interlamellar space, but the degree of adsorption is low except for adenine, adenosine, uracil and uridine. The nucleotides are adsorbed in the interlamellar space and on the crystal edges. In contrast, polymers are adsorbed at the crystal edges. This is shown by the slight differences between HDTMA-treated clays and natural clays with respect to the phosphate-treated clays, in which the adsorption was smaller.

The maximum adsorption takes place at acidic pHs. The order of adsorption at pH 2 for the purines is adenine = poly A > adenosine > AMP > ATP > ADP. The pyrimidines were adsorbed to a lesser extent than the purines; the order of adsorption follows the same trend, except UTP that has not been adsorbed at all. Differences in the adsorption of the nucleotides are very small and the dispersion with the used methods is large.

Although the maximum adsorption occurs at pH 2, it is important to remark that such pH most probably did not exist in the primitive Earth. However, the data presented sustains the relevance

of the microenvironments to explain the origin of life.

Acknowledgements

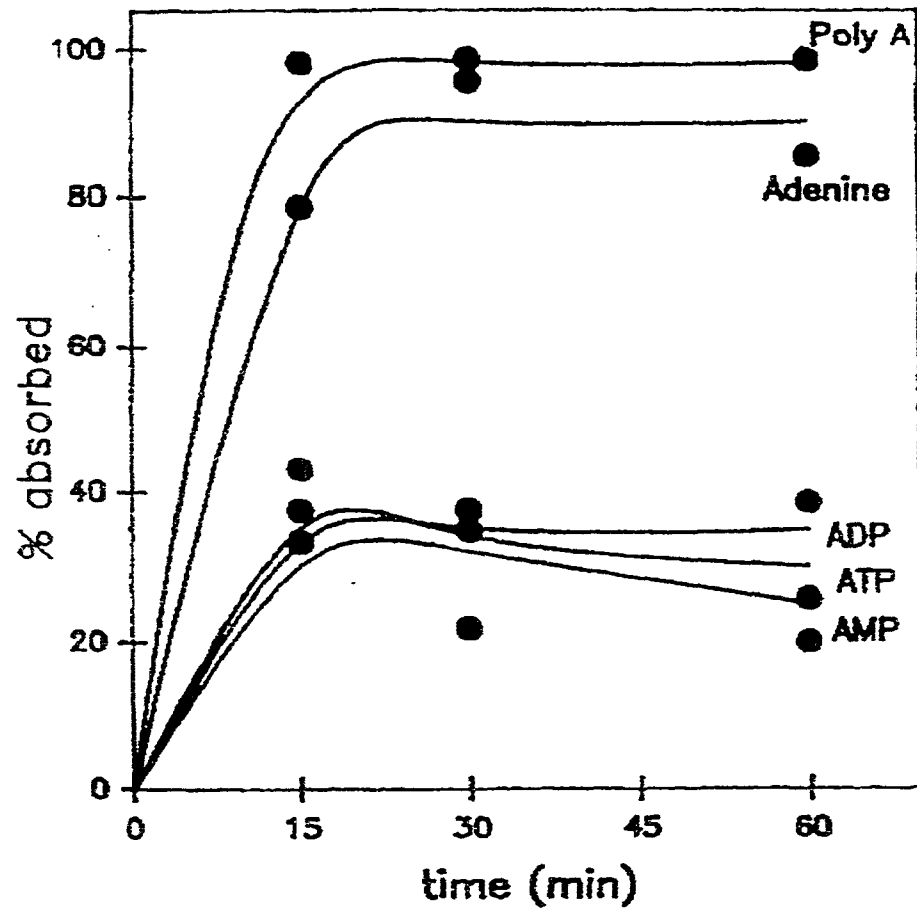
The authors acknowledge the contributions of Alejandra Serratos and Carmen Peza with the chemistry work, Bernabé Rico (Perkin-Elmer) for the use of the IR software, and Aurelia Maturano with the diffraction analysis. This project was supported in part by a grant from DGAPA IN-1106295.

References

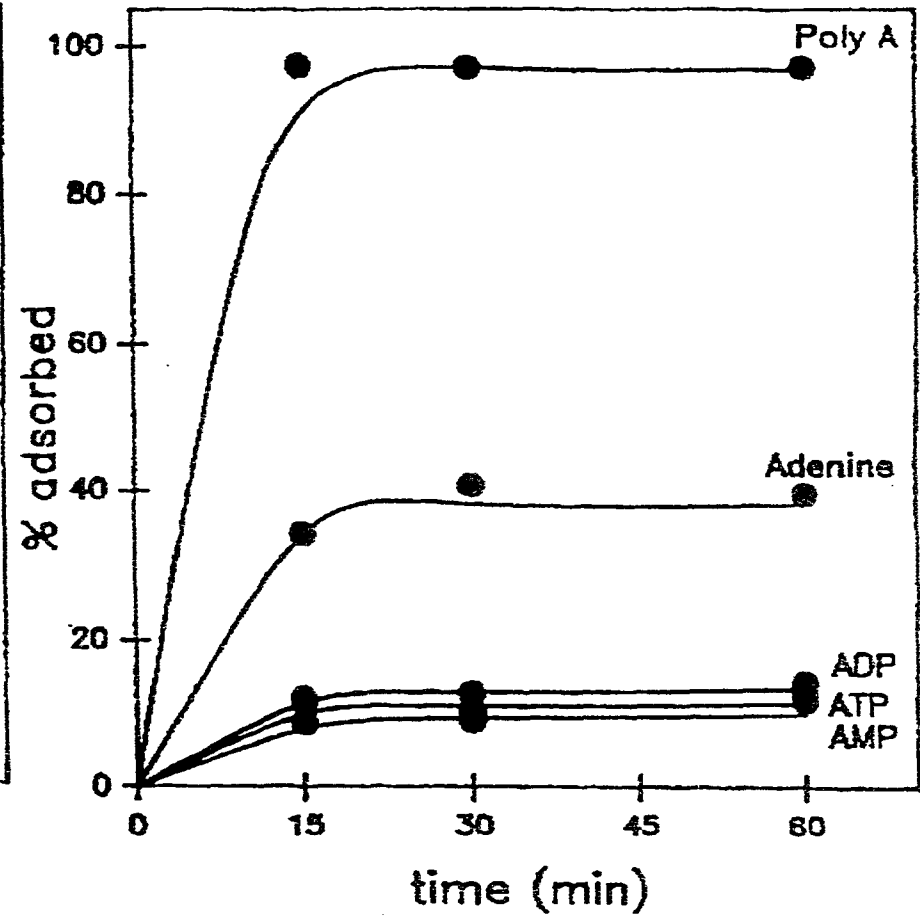
- Bernal, J.D.: 1951, *The Physical Basis of Life*, Routledge and Kegan Paul, London.
- Bellami, L.J.: 1975, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Chapman and Hall, London.
- Boyd, S.A., Shaobai, S., Lee, J. and Mortland, M.M.: 1988, *Clays and Clay Minerals*, **36** (2), 125.
- Cairns-Smith, A.G.: 1966, *J. Theor. Biol.* **10**, 53.
- Heller-Kallai, L.: 1975, *Proc. Int. Clay Conf.*, Applied Publishing, Ltd. Willmette, Illinois, U.S.A., 361.
- Lahav, N. and White, D.H.: 1980, *J. Mol. Evol.*, **16**, 11.
- Lailach, G.E., Thompson, T.D. and Brindley, G.W.: 1968a, *Clays and Clay Minerals*, **16**, 285.
- Lailach, G.E., Thompson, T.D. and Brindley, G.W.: 1968b, *Clays and Clay Minerals*, **16**, 295.
- Lailach, G.E. and Brindley, G.W.: 1969, *Clays and Clay Minerals*, **17**, 95.
- Lagaly G. and Weiss, A.: 1969, *Proc. Int. Clay Conf.*, Israel University Press, Tokyo **1**, 61.
- Lyons, J.W.: 1964, *J. Colloid Sci.*, **19**, 399.
- Muljadi, D., Posner, A.M. and Quirk, J.P.: 1966, *J. Soil Sci.* **17**, 212.
- Odom, D.G., Rao, M., Lawless, J.G. and Oro, J.: 1979, *J. Mol. Evol.*, **12**, 365.
- Reynolds, Jr., R.C.: 1988, *Clay Minerals and the Origin of Life*, Cairns-Smith, A.G. and Hartman, H. (eds.), Cambridge University Press, Great Britain, p.46.
- Rao, M., Odom, D.G. and Oro, J.: 1980, *J. Mol. Evol.* **15**, 317.
- Russell, J.D., Farmer, V.C. and Velde, B.: 1970, *Mineral Mag.*, **37**, 869.
- Russell, J.D. and Fraser, A.R.: 1971, *Clays and Clay Minerals*, **19**, 55.

PURINES AND THEIR DERIVATIVES

IN Na-MONTMORILLONITE



IN MONTMORILLONITE-HDTMA



- Albert, J.T. y Harter, R.D. (1973) *Soil. Sci.* 115, 130.
- Alberts, B.M. (1986) *Amer. Zool.* 26, 781.
- Altman, S. (1978) *Cell* 36, 237.
- Yerson, D.M. y Banin, A. (1975) *Origins of Life* 6, 23.
- Armstrong, D.E. y Chesters, G. (1964) *Soil. Sci.* 98, 39.
- Bailey, S.W. (1963) *Am. Mineral* 48, 1196.
- Bailey, S.W. (1986) "Layer silicate structures" en A.G. Cairn-Smith y H. Hartman (eds.) Clay Minerals y the Origin of Life. Cambridge University Press.
- Bellami, L.J. (1975) The infrared spectra of complex molecules. Chapman y Hall, London.
- Bernal, J.D. (1951) The Physical Basis of Life. Routledge y Kegan Paul, London.
- Boyd, S.A. y Mortly, M.M. (1986) *J. Mol. Catalysis* 34, 1.
- Burton, F.G. y Newman, W.F. (1971) *Currents in Mod. Bio.* 4, 47.
- Cech, T.R., Zaug, A.J. y Grabowsky P.J. (1982) *Cell* 27, 487.
- Decker, P., Schweer, H. y Pohlmann, R. (1982) *J.Chromatog.* 244, 281.
- Dunbar, C.O. y Rodgers, H. (1979) Principios de estratigrafía. Cia. Edit. Continental, México, p. 205.
- Edelson, E.H. y Lawless, J.G. (1980) *Life Sci. Space Res.* 8. Pergamon Press, Oxford.
- Ferris, J.P. y Hagan Jr. W.J. (1986) *Origins Life Evol. Biosphere* 17, 69.
- Ferris, J.P., Joshi, P.C., Edelson, E.H. y Lawless, J.G. (1978) *J. Mol. Evol.* 11, 293.
- Ferris, J.P., Edelson, E.H., Mount, N.M. y Sullivan, A.E. (1979) *J. Mol. Evol.* 13, 317.
- Ferris, J.P., Gözen, E. y Agarwal, V.K. (1989a) *Origins Life Evol. Biosphere* 19, 153.
- Ferris, J.P., Gözen, E. y Agarwal, V.K. (1989b) *Origins Life Evol. Biosphere* 19, 165.
- Friebele, E., Shimoyama, A. y Ponnampereuma, C. (1980) *J. Mol. Evol.* 16, 153.
- Friebele, E., Shimoyama, A. y Ponnampereuma, C. (1981a) *Origins of Life*, Proc. 6th. Int. Conf. Jerusalem, Israel, 337.
- Friebele, E., Shimoyama, A., Hare, P.E. y Ponnampereuma, C. (1981b) *Origins of Life* 11, 173.

- Fripiat, J.J. y Cruz-Cumplido, M. (1974) *Ann. Rev. Earth Planet Sci.* 2, 239.
- Gabel, N. y Ponnampereuma, C. (1967) *Nature* 216, 453.
- Garrels, R.M. y Mackenzie, F.T. (1971) Evolution of Sedimentary Rocks. WW Norton, N.Y.
- Gilbert, W. (1986) *Nature* 319, 618.
- Graf, G. y Lagaly, G. (1980) *Clays Clay Min.* 28, 12.
- Grim, R.E. y Güven, N. (1978) Developments in Sedimentology 24: Bentonites, Geology, Mineralogy, Properties and Uses. Elsevier, Amsterdam.
- Haldane, J.B.S. (1929) en Bernal, J.D. (1967) The origin of life. World Publ. Co., Clevely, p. 242.
- Harvey, G.R., Degens, E.T. y Mopper, K. (1971) *Naturwiss.* 58, 624.
- Joyce, G.F., Vischer, G.M., Van Boeckel, C.A.A., van Boom, J.H., Orgel, L.E. y Van Westrenen, J. (1984) *Nature* 310, 602.
- Joyce, G.F., Schwartz, A.W., Orgel, L.E. y Miller, S.L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4389.
- Joyce, G.F. (1989) *Nature* 338, 217.
- Lahav, N. y White, D. (1980) *J. Mol. Evol.* 16, 11.
- Lahav, N. y White, D.H. (1980) *J. Mol. Evol.* 16, 11.
- Lailach, G.E. y Brindley, G.W. (1969) *Clays Clay Min.* 17, 95.
- Lailach, G.E., Thompson, T.D. y Brindley, G.W. (1968a) *Clays Clay Min.* 16, 285.
- Lailach, G.E., Thompson, T.D. y Brindley, G.W. (1968b) *Clays Clay Min.* 16, 293.
- Lazcano, A. (1986) *Treballs. Soc. Cat. Biol.* 39, 73.
- Lazcano, A., Fox, G.E. y Oró, J.F. (1992) in J.P. Mortlock (edit.) The Evolution of Metabolic Function. CRC Press, Boca Raton.
- Lazlo, P. (1987) *Science* 235, 1473.
- Levine, J.S. (1982) *J. Mol. Evol.* 18, 161.
- Lyons, J.W. (1964) *J. Colloid. Sci.* 19, 399.
- McLaren, A.D. Peterson, G.H. y Barshad, I. (1958) *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 22, 239.
- Miller, S.L. (1953) *Science* 117, 528.
- Mosqueira, F.G. (1979) *BioSystems* 11, 233.
- Mosqueira, F.G., Albarrán, G. y Negrón-Mendoza, A. (en prensa)
- Nagy, B. (1975) Carbonaceous meteorites. Elsevier, N.Y.

- Odin, G.S. (1986) "The origin of clays on Earth" en A.G. Caim-Smith y H. Hartman (eds.) Clay Minerals and the Origin of Life. Cambridge University Press.
- Odom, P.G., Rao, M., Lawless, J.G., y Oró, J. (1979). *J. Mol. Evol.* **12**, 365
- Oparin, A.I. (1924) en Bernal, J.D. (1967) The origin of life. World Publ. Co., Clevely, p. 119.
- Oparin, A.I. (1972) en Ponnampereuma, C. (editor) Exobiology. North Holly, Amsterdam, p. 1.
- Orgel, L.E. (1986) *J. Theor. Biol.* **123**, 127.
- Pinnavaia, T.J. y Mortly, M.M. (1986) "Aspects of clay catalysis" in A.G. Caim-Smith y H. Hartman (eds.) Clay Minerals and the Origin of Life. Cambridge University Press.
- Poncelet, G., Van Assche, A.T. y Fripiat, J.J. (1975) *Origins of Life* **6**, 401.
- Ponnampereuma, C., Shimoyama, A. y Friebele, E. (1982) *Origins of Life* **12**, 9.
- Rao, M., Odom, D.G. y Oró, J. (1980) *J. Mol. Evol.* **15**, 317.
- Seegerer, A.H., Burggraf, S., Fiala, G., Huber, G., Huber, R., Pley, U. y Stetter, K.O. (1993) *Origins of Life* **23** (1), 77.
- Shimoyama, A. y Ponnampereuma, C. (1980) in P.E. Hare, T.C. Hoering y K. King Jr. (eds.) Biogeochemistry of Amino Acids. John Wiley y Sons, N.Y. p. 145.
- Smith, R.M. y Martell, A.E. (1989) Critical stability constants, vol. 6, 2nd. supplement. Plenum Press, N.Y.
- Spach, G. (1984) *Origins Life. Evol. Biosphere* **14**, 433.
- Swartzen-Allen, S.L. y Matijevic, E. (1974) *Chem. Rev.* **74**, 385.
- Ts'o, P.O.P., Mervin, I.S. y Olsen, A.C. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1289.
- Visscher, J. y Schwartz, A.W. (1990) *J. Mol. Evol.* **31**, 163.
- Voet, A.B. y Schwartz, A.W. (1982) *Origins Life Evol. Biosphere* **12**, 45.
- Yoshino, D., Hayatsu, R. y Yers, E. (1971) *Geochim. Cosmochim. Acta* **35**, 927.