



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**MODELOS DE MICROAMBIENTES SEDIMENTARIOS  
PARA LA PROTECCIÓN DE MOLÉCULAS BIO-ORGÁNICAS  
EN LA TIERRA PRIMITIVA: ESTUDIO CON  
MONTMORILLONITA DE SODIO Y NUCLEÓSIDOS**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

QUÍMICA. ELLEN YVETTE AGUILAR OVANDO



TUTOR: DRA. ALICIA NEGRÓN MENDOZA AÑO: 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

La presente tesis de maestría fue desarrollada en el Laboratorio de Química de Radiaciones y Evolución Química del Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica del Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Avances del presente trabajo se presentaron en los siguientes eventos:

**RadChem 2010**

Mariánské Lázně, República Checa, 18-23 de abril de 2010.

**Gordon Research Conferences 2010 (*Origin of Life*)**

Galveston, Texas, Estados Unidos, 10-15 de enero, 2010.

**QuimiUNAM 2009**

México, D. F., 18-20 de noviembre de 2009.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, y en especial al Posgrado en Ciencias Químicas, por permitirme estudiar, que es lo que más me gusta en esta vida.

A CONACYT, por la beca de estudios otorgada (no. de becaria: 216380) y el apoyo para la escritura de la tesis, a través del proyecto no. 82937.

A PAPIIT (proyecto IN223406).

A la Dra. Alicia Negrón Mendoza, por dirigir esta tesis y su apoyo durante toda la maestría.

A los miembros del jurado, Dr. Manuel de Jesús Salmón Salazar, Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko, Dra. Fabiola Monroy Guzmán, Dr. Emilio Bucio Carrillo y M. en C. Trinidad Martínez Castillo, por revisar y brindar sugerencias para mejorar el manuscrito.

A los trabajadores de la Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares, en especial al Físico Francisco García Flores, por su ayuda en la irradiación de muestras.

A todos los miembros del Instituto de Ciencias Nucleares que de alguna forma colaboraron para hacer posible la realización de este trabajo.

*A mis padres Rommel y Ana María,  
Mi hermana Krista,  
Mi amigo Rodrigo.*

# Índice de Contenido

	Página
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
A. Antecedentes.....	2
1. Origen de la Vida: Evolución Química.....	2
a. La Tierra Primitiva: Eón Arcaico.....	3
i. Fuentes de Energía	
ii. Hidrósfera	
iii. Atmósfera	
b. Las Arcillas.....	7
i. Montmorillonita de Sodio	
ii. Participación de las Arcillas en la Evolución Química	
2. Los Nucleósidos.....	12
a. Síntesis Abiótica de Nucleósidos.....	13
B. Objetivos.....	15
C. Justificación.....	15
D. Hipótesis.....	16
III. Materiales y Métodos.....	17
A. Materiales.....	17
1. Reactivos.....	17
2. Equipo Analítico.....	17
B. Procedimiento Experimental.....	18
1. Lavado de cristalería.....	18
2. Preparación de Disoluciones de Nucleósidos y Bases Nitrogenadas.....	18
3. Análisis de soluciones patrón.....	18
a. Espectroscopia UV-vis.....	18
b. Cromatografía HPLC.....	18
4. Pruebas de Adsorción.....	19
a. Análisis por Difracción de Rayos X.....	20
5. Pruebas de Desorción.....	20
6. Experimentos de Irradiación.....	21
7. Experimentos de Desección.....	22
IV. Resultados.....	24
V. Discusión de Resultados.....	40
A. Pruebas de Adsorción.....	41
B. Pruebas de Desorción.....	44
C. Experimentos de Irradiación.....	45
D. Experimentos de Desección.....	46
VI. Conclusiones y Consideraciones Finales.....	48
VII. Referencias Bibliográficas.....	49
VIII. Anexos.....	53

# Índice de Figuras

	Página
<b>Fig. 1.</b> Hoja tetraédrica de arcilla.....	8
<b>Fig. 2.</b> Hoja octaédrica de arcilla.....	8
<b>Fig. 3.</b> Tipos de arcillas según su estructura.....	9
<b>Fig. 4.</b> Distribución de cargas en la unidad estructural de la montmorillonita de sodio.....	9
<b>Fig. 5.</b> Estructura química de los nucleósidos seleccionados para el estudio.....	12
<b>Fig. 6.</b> Síntesis de $\alpha$ -citidina por el método reportado por Sánchez y Orgel (1970).....	14
<b>Fig. 7.</b> Esquema de la disposición de las muestras dentro de la cámara del irradiador.....	21
<b>Fig. 8.</b> Curva de absorción de adenosina.....	24
<b>Fig. 9.</b> Análisis por HPLC de la estabilidad de adenosina a tres pH durante 12 días	
<b>a.</b> Disolución a pH=2.....	24
<b>b.</b> Disolución a pH=5.....	25
<b>c.</b> Disolución a pH=8.....	25
<b>Fig. 10.</b> Curvas de estabilidad de nucleósidos a pH entre 2 y 10 durante 12 días	
<b>a.</b> Adenosina.....	26
<b>b.</b> Guanosina.....	26
<b>c.</b> Citidina.....	26
<b>d.</b> Uridina.....	27
<b>e.</b> Xantosina.....	27
<b>Fig. 11.</b> Separación de nucleósidos y sus bases nitrogenadas: HPLC de una mezcla.....	28
<b>Fig. 12.</b> Curva de adsorción de nucleósidos a pH 2 y 6.....	29
<b>Fig. 13.</b> Espectros de difracción de rayos X de nucleósidos adsorbidos en arcilla	
<b>a.</b> Adenosina adsorbida a pH=2.....	30
<b>b.</b> Adenosina adsorbida a pH=6.....	30
<b>c.</b> Guanosina adsorbida a pH=2.....	31
<b>d.</b> Citidina adsorbida a pH=2.....	31
<b>e.</b> Uridina adsorbida a pH=2.....	31
<b>f.</b> Xantosina adsorbida a pH=2.....	31
<b>Fig. 14.</b> Porcentaje de desorción de nucleósidos a pH 5 y 8 y su variación con el tiempo que permanecen adsorbidos.....	32
<b>Fig. 15.</b> Desorción de uridina: análisis por HPLC de primera y segunda extracción.....	33
<b>Fig. 16.</b> Irradiación de nucleósidos en ausencia de arcilla: curva de descomposición.....	33
<b>Fig. 17.</b> Análisis por HPLC de adenosina y citidina irradiados en ausencia de arcilla	
<b>a.</b> Estándares de nucleósidos y sus bases nitrogenadas sin irradiar.....	34
<b>b.</b> Disolución de nucleósidos irradiada 30 min (dosis = 5.17 KGy).....	34
<b>c.</b> Disolución de nucleósidos irradiada 1 h (dosis = 10.34 KGy).....	34
<b>d.</b> Disolución de nucleósidos irradiada 2 hrs (dosis = 20.68 KGy).....	35
<b>e.</b> Disolución de nucleósidos irradiada 4 hrs (dosis = 41.36 KGy).....	35
<b>f.</b> Disolución de nucleósidos irradiada 5 hrs (dosis = 51.70 KGy).....	35
<b>Fig. 18.</b> Descomposición de nucleósidos en presencia de arcilla: análisis por HPLC	
<b>a.</b> Adenosina.....	36
<b>b.</b> Citidina.....	36
<b>Fig. 19.</b> Desecación a distintas temperaturas de nucleósidos adsorbidos en arcilla: análisis por HPLC	
<b>a.</b> Adenosina.....	38
<b>b.</b> Citidina.....	38
<b>c.</b> Xantosina.....	39

## Índice de Tablas

	Página
<i>Tabla. 1.</i> Fuentes de energía presentes en la Tierra primitiva.....	4
<i>Tabla. 2.</i> Intensidad de dosis de irradiación en la cámara del Gammabeam 651.....	21
<i>Tabla. 3.</i> Máximos de absorción de nucleósidos.....	24
<i>Tabla. 4.</i> Porcentaje de adsorción de los nucleósidos a pH=2.....	29
<i>Tabla. 5.</i> Porcentaje de nucleósidos y bases nitrogenadas presentes a distintos tiempos de irradiación en ausencia de arcilla.....	36
<i>Tabla. 6.</i> Porcentaje de nucleósidos presentes en muestras irradiadas en presencia de arcilla.....	37
<i>Tabla. 7.</i> Porcentaje de nucleósidos y sus bases nitrogenadas recuperados tras deseccación de la arcilla a distintas temperaturas.....	39
<i>Tabla. 8.</i> Sitios de ionización y pKa de nucleósidos.....	42

## I. Abstract

In this work it is been examined the influence of Sodium Montmorillonite on the chemical transformations undergone by five nucleosides (cytidine, uridine, adenosine, guanosine and xanthosine) when subjected to conditions simulating the primitive Earth during the period of chemical evolution. The experiments prove the hypothesis of the concentration capacity and protective role against external sources of ionizing radiation (specifically  $\gamma$ -ray) that some solid surfaces (like clays) can provide to organic compounds adsorbed on them. By using X-ray diffraction, UV-vis spectrophotometry and HPLC for the analysis it was found that purinic nucleosides (more than pyrimidinic) are quickly adsorbed on clay at low pH values, and they are desorbed in neutral or lightly basic aqueous solutions. It was found that nucleosides, in general, are protected by clay. The temperature of mineral desiccation applied after purinic nucleosides adsorption promotes their decomposition into their corresponding nitrogenous bases. Pyrimidinic nucleosides show more resistance to heat, but less resistance against ionizing radiation, even when adsorbed in clay.

## I. Resumen

En este trabajo se examina la influencia de la Montmorillonita de Sodio en las transformaciones químicas sufridas por cinco nucleósidos (adenosina, guanosina, citidina, uridina y xantósina) al ser sometidos a condiciones que simulan la Tierra primitiva durante el período de evolución química. Los experimentos prueban la hipótesis de la capacidad concentradora y el papel protector contra fuentes externas de radiación ionizante (específicamente rayos gamma) que algunas superficies (como las arcillas) pueden brindar a compuestos orgánicos adsorbidos en ellas. Mediante el uso de difracción de rayos X, espectrofotometría UV-vis y HPLC, se encontró que los nucleósidos purínicos (más que los pirimidínicos) son rápidamente adsorbidos a valores bajos de pH, y desorbidos en soluciones acuosas de pH neutro o ligeramente básico. Se encontró que los nucleósidos, en general, son protegidos por la arcilla. La temperatura de desecación aplicada al mineral en que se adsorben los nucleósidos purínicos promueve la descomposición en sus bases nitrogenadas correspondientes. Los nucleósidos pirimidínicos muestran mayor resistencia al calentamiento, pero menor resistencia ante la radiación ionizante, aún cuando se encuentren adsorbidos en arcilla.

## II. Introducción

### A. Antecedentes

#### 1. Origen de la Vida: Evolución Química

El origen de la vida en nuestro planeta y su evolución constituyen un enigma que ha ocupado al hombre desde el comienzo de su historia. Sin embargo, a pesar de haber sido una constante en el quehacer histórico-científico de la humanidad, no fue sino hasta 1953 (Miller, 1953) cuando fue posible abordar experimentalmente ésta búsqueda.

Previo a ello se desarrollaron múltiples enfoques (como la generación espontánea, y la panspermia), todos ellos encaminados a entender los procesos que dieron lugar a ese complicado fenómeno que llamamos vida.

Hoy en día se reconoce que el surgimiento de la vida requirió, por lo menos de cuatro pasos: 1) la formación de bio-moléculas, 2) el ensamblaje de sistemas macromoleculares, 3) la emergencia de moléculas con ciclos de auto replicación, y 4) procesos de evolución molecular por selección natural (Hazen, 2005), por lo que su estudio se ha dividido en tres etapas: Evolución Química o Síntesis Abiótica, Evolución Prebiológica y Evolución Biológica (Negrón Mendoza y Albarrán, 1993).

Tradicionalmente se considera que fueron Alexander Ivánovich Oparín y John Burdon Sanderson Haldane, en 1924 y 1929 respectivamente, quienes sentaron las bases de lo que actualmente se conoce como Evolución Química (Luisi, 1998). La hipótesis de Oparín-Haldane, señala que la vida se originó por medio de la síntesis abiótica y la consecuente acumulación de compuestos orgánicos, a través de una serie de procesos físicos y químicos. Así, la *Evolución Química* puede entenderse como la química de la formación y organización de compuestos bio-orgánicos bajo condiciones que se supone son geológica y astronómicamente primitivas (Negrón Mendoza y Albarrán, 1993).

Se postula que posteriormente estos primeros compuestos orgánicos con vidas medias altamente variables (Miller *et al.*, 1986) y dependientes de micro-ambientes específicos, se transformaron en aquellos polímeros clave con capacidades químicas para la aparición de la vida: autocatálisis y autorreplicación en una etapa conocida como evolución molecular.

Tomando como base las premisas de Oparín y Haldane, se desarrollaron numerosos trabajos, entre los que sobresalen los experimentos realizados por Harold Clayton Urey y Stanley L. Miller, que demuestran la síntesis abiótica de moléculas orgánicas de

importancia biológica, simulando las condiciones que se creía prevalecieron en la atmósfera reductora primitiva (Urey, 1952; Miller, 1953). También destacan los trabajos de Joan Oró i Florensa, quien planteó la posibilidad de sintetizar adenina a partir de HCN en las condiciones de la Tierra primitiva (Oró, 1961), y los de John Desmond Bernal, quien propuso a las arcillas como agentes concentradores, protectores y/o catalizadores de moléculas importantes en el surgimiento de la vida (Bernal, 1951).

Aunque el concepto de Evolución Química se halla bien definido, es difícil ubicar el proceso en un tiempo y espacio concreto. Según las evidencias actuales (sujetas a controversia siempre), la vida debió aparecer tras el enfriamiento del planeta que siguió al intenso bombardeo tardío de cometas, meteoros y planetesimales (materiales sólidos condensados a partir de la nebulosa solar), hace unos 3,500 millones de años, cuando la tasa de bombardeo alcanzó su valor actual (Maher y Stevenson, 1988; Sleep, *et al.*, 1989) y la superficie de la Tierra se hizo lo suficientemente hospitalaria como para permitir la síntesis de moléculas orgánicas (Draganič y Draganič, 1978).

No se puede determinar con certeza, pero se cree que lo más probable es que la vida no se haya generado una única vez, dadas las características de la evolución de la Tierra desde sus orígenes. Inclusive, se ha propuesto que los impactos pudieron haber tenido efectos benéficos, siendo fuente importante de compuestos químicos volátiles y orgánicos (Chyba y Sagan, 1992; Greenberg y Mendoza-Gómez, 1992; Oró, *et al.*, 1992).

#### **a. La Tierra Primitiva: Eón Arcaico**

El escenario geológico propuesto para la evolución química abarca aproximadamente los primeros 200,000 años en la Tierra, es decir durante el Arqueano (Eón Arcaico) y hasta inicios del Proterozoico (hace 2,500 millones de años), de acuerdo a la información actual de rocas y minerales carbonatadas.

El Eón Arcaico es la segunda división geológica del Tiempo Precámbrico. Comienza hace 3,800 millones de años (después del Eón Hadeico) y finaliza hace 2,500 millones de años (cuando comienza el Eón Proterozoico) durando aproximadamente 1,300 millones de años (Cooper, *et al.*, 1986).

En este período se produce una evolución de la corteza terrestre, por lo cual tuvo que haber movimiento de placas y una estructura interna terrestre similar a la que conocemos hoy en día, aunque la diferenciaba el exceso de calor. Se calcula que

había más actividad tectónica debido a la mayor velocidad en que se produce la litosfera y un mayor número de placas más pequeñas, no habiéndose formado grandes continentes hasta finales del Arcaico, puesto que la alta tasa de actividad geológica impedía la coalescencia en unidades más grandes.

En contraste con el Proterozoico, las rocas arcaicas son a menudo sedimentos de aguas profundas fuertemente metamorfoseados, tales como grauvacas, esquistos arcillosos, sedimentos volcánicos y formaciones de hierro bandeado. Las rocas carbonatadas son raras, lo que indica que los océanos eran más ácidos que durante el Proterozoico debido a la disolución de dióxido de carbono (Stanley, 1999).

#### i. Fuentes de Energía

La transformación de moléculas simples y precursores orgánicos en moléculas relevantes biológicamente como aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, y polímeros fue posible por la acción de diversas fuentes de energía en la Tierra primitiva, entre las cuales se incluyen luz UV, descargas eléctricas, rayos cósmicos provenientes del espacio exterior, decaimientos radiactivos, energía térmica (volcánica) y ondas de choque (Miller, 1986; Negrón-Mendoza y Albarrán, 1993). La cantidad de energía disponible para cada fuente se calcula sustancialmente distinta (Véase Tabla 1.), y por tanto, los efectos que se supone tuvieron sobre los procesos de evolución química difieren.

Fuente	Energía ( $cal/cm^2 \cdot año$ )
Radiación UV	4005.7
Descargas eléctricas	4
Radioactividad	2.8
Ondas de choque	1.1
Energía térmica (volcánica)	0.13
Rayos cósmicos	0.0015

*Tabla 1. : Fuentes de energía presentes en la Tierra primitiva  
(Miller y Orgel, 1974)*

Los rayos cósmicos fueron la fuente menor de energía disponible, y probablemente sólo produjeron reacciones en la parte alta de la atmósfera (Miller, 1986).

La energía térmica no pudo ser muy efectiva para la síntesis de compuestos orgánicos en la atmósfera primitiva, debido a que para producir reacciones, las

mezclas de gases atmosféricos requieren más de 600°C, y deben enfriarse rápidamente (Miller y Orgel, 1974). Sin embargo, la actividad volcánica submarina puede haber funcionado en las reacciones de evolución química (Washington, 2000).

Las ondas de choque, producto de los impactos de cuerpos espaciales, se han empleado en experimentos de química prebiótica, como fuente de energía para la síntesis de aminoácidos y ácidos carboxílicos (Negrón-Mendoza, 1993).

Las descargas eléctricas constituyen la segunda fuente de energía en magnitud, y primera en eficiencia en reacciones de síntesis abiótica dentro de atmósferas reductoras, por lo que son la fuente más empleada en experimentos de evolución química (Navarro-González, *et al.*, 2001).

La radiación UV fue la fuente de energía más abundante, pero los rendimientos de las reacciones producidas con ella en condiciones prebióticas son bajos, aunque probablemente sus efectos fuesen mayores en la parte alta de la atmósfera, en reacciones fotolíticas (Miller, 1986).

Finalmente, la radiación ionizante, pese a no haber sido tan abundante, tiene gran capacidad de penetración en la materia y ha demostrado ser eficiente en experimentos de química de radiaciones, como la síntesis de monómeros y polímeros de importancia biológica, por lo que ha sido propuesta por autores como Ponnampertuma, Draganič, y Negrón-Mendoza (Negrón-Mendoza y Albarrán, 1993). Esta energía proviene de la corteza terrestre (de radionúclidos formados por procesos nucleares en las estrellas, especialmente:  $^{40}\text{K}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{244}\text{Pu}$ ), rayos cósmicos no solares, rayos solares y radiación corpuscular geomagnética (Guzmán-Marmolejo, 2003).

De los isótopos radiactivos de vida media larga ( $1.277 \times 10^9$  años), el más ampliamente distribuido fue el  $^{40}\text{K}$ , principalmente en el océano, sedimentos y arcillas. La tasa de dosis que pudo ser liberada por este radionúclido en las arcillas fue de  $1.75 \times 10^2$  Gy/año (Mosqueira, *et al.*, 1996).

## ii. Hidrósfera

La hidrósfera de la Tierra Primitiva tuvo un papel fundamental en el surgimiento de la vida, según las teorías de evolución química, puesto que en ella

se formaron y difundieron las moléculas bio-orgánicas (Negrón-Mendoza, *et al.*, 1992).

Se ha sugerido que los océanos podrían haber aparecido en el eón Hadeico tan temprano como 200 millones de años después de la formación de la Tierra, en un ambiente caliente (100°C) y reductor, con un pH inicial de 5.8 que subió rápidamente hacia la neutralidad. Esta idea ha sido apoyada por la datación de cristales de zircón encontrados en cuarcitas metamórficas en Australia occidental, y otros estudios realizados en el cinturón de basalto de Nuvvuagittuq, al norte de Quebec, empleando neodimio-142, que confirman que los océanos y la corteza continental existieron dentro de los 150 primeros millones de años tras la formación de la Tierra (Kasting, 1993; Sagan y Mullen, 1972, Schidlowski, *et al.*, 1979).

Se supone que hubo una época de bombardeo profundo y continuos de cometas que generaron una atmósfera de vapor densa, que al cambiar la temperatura permitió la condensación y formación de los océanos, cuya masa se acumuló en el período comprendido entre 4,400 y 3,900 millones de años (Chang, 1994).

Se cree que los océanos primitivos ya formados tenían una temperatura entre 30° y 50°C hace 3,500 millones de años (Lowe, 1994). Sin embargo, no hay consenso sobre el pH que tuvieron, y existen numerosas hipótesis que proponen valores de entre 9 y 11 (Kasting, 1993),  $8.1 \pm 0.2$ , similar al actual (Sillén, 1967) y/o 6, con algunos microambientes de pH hasta de 1 (Walker, 1985).

### **iii. Atmósfera**

La composición química de la atmósfera se ha considerado un factor de gran importancia en los experimentos de evolución química y estudios prebióticos (Vega-Arreguín, 1998), ya que sus componentes pudieron formar parte de las reacciones abióticas al entrar en contacto con los componentes de la hidrósfera.

Se cree que en el momento de la evolución química, la atmósfera tuvo un carácter ligeramente reductor o neutro, producto de la presencia de H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, S<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, principalmente, los cuales provocarían un efecto invernadero que ayudaría a mantener la temperatura de la superficie terrestre entre los 30° y 50°C (Lowe, 1994).

Originalmente, la Tierra debió haber tenido una atmósfera con composición muy similar a la de la nebulosa primordial de la cual se formó el Sistema Solar. Por lo tanto, debió ser rica en hidrógeno, el cual redujo al carbono y nitrógeno presentes, formando  $\text{CH}_4$  y  $\text{NH}_3$  en cantidades importantes (Walker, 1977). Esta *atmósfera primaria* pudo contener también de  $\text{H}_2$ , He,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{H}_2\text{S}$ , y presentaba un carácter reductor, que se sabe hoy día es apropiado para la síntesis efectiva de aminoácidos y otros compuestos esenciales para la vida (Chang, 1994).

Con el tiempo, la atmósfera sufrió cambios, perdiéndose los gases más ligeros ( $\text{H}_2$ , He, etc., por la acción del calor emitido por el sol y la debilidad del campo gravitacional generado por la Tierra, comparado con el de los planetas gigantes como Júpiter y Saturno) hacia el espacio exterior (Lazcano-Araujo, 1991). Al mismo tiempo ocurrió la pérdida de los componentes más abundantes, el  $\text{NH}_3$  y el  $\text{CH}_4$ , por fotólisis (Levine, *et al.*, 1982), y ocurrieron emisiones volcánicas y degasificación de la corteza terrestre, ocasionadas probablemente por el calentamiento producido durante la acreción, o por la producción de energía por decaimiento de elementos radiactivos (Ponnamperuma, 1981; Levine, *et al.*, 1982; Owen, 1985), dando como resultado la aparición de una *atmósfera secundaria* (Could, 1977; Owen, 1985).

Más adelante disminuyó la concentración de  $\text{CO}_2$  por la formación de depósitos de carbonatos en los continentes (Kasting, 1993), favorecidos por la permanencia de agua en la Tierra, que facilitó la fijación de este gas (Mason, 1992).

#### **b. Las Arcillas**

La presencia de arcillas en la Tierra es muy antigua, y se tiene evidencia geológica de su existencia hace aproximadamente  $3.8 \times 10^9$  años, la mayoría formándose durante el Arqueano. (Rao *et al.*, 1980).

Las arcillas tienen un área superficial alta y una distribución de carga superficial específica. Están asociadas con iones metálicos intercambiables y poseen una capacidad de adsorción variable para cada tipo de material orgánico.

Esencialmente están constituidas por silicio, aluminio, oxígeno e hidrógeno (Domínguez y Schifter, 1992), y algunos autores las consideran dentro del grupo de los filosilicatos (Colín-García, 1999). Estructuralmente están formadas por dos tipos

de láminas: con arreglos cristalinos tetraédricos de Si-O (“hojas tetraédricas” de simetría hexagonal) y con arreglos cristalinos octaédricos de aluminio o Mg-O-OH, apiladas unas sobre otras.

En las capas tetraédricas de Si-O, el átomo de silicio está coordinado a cuatro átomos de oxígeno, de modo que tres átomos de oxígeno están compartidos con tres tetraedros vecinos y un cuarto átomo de oxígeno está libre (Véase Fig. 1.), y puede ser compartido por otra lámina. Los átomos tetravalentes de silicio pueden ser sustituidos por aluminio trivalente.

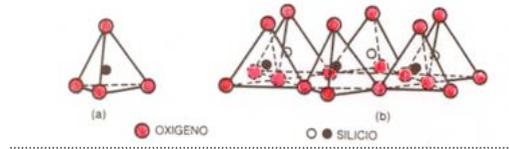


Fig. 1.: Hoja tetraédrica de arcilla

En las láminas octaédricas de aluminio o Mg-O-OH, el átomo metálico está coordinado con seis átomos de oxígeno o de hidroxilo, localizados en los vértices de un octaedro regular. Los átomos de oxígeno o grupos hidroxilo se encuentran en dos planos paralelos, con los átomos metálicos entre ambos planos, formando un empaquetamiento hexagonal compacto (Véase Fig. 2.), conocido como “hoja octaédrica de alúmina (gibsite) o magnesia (brusita)” (Guzmán-Marmolejo, 2006). El aluminio trivalente puede ser reemplazado por magnesio divalente, o por Fe, Cr, Zn, entre otros átomos (Van Olphen, 1977).

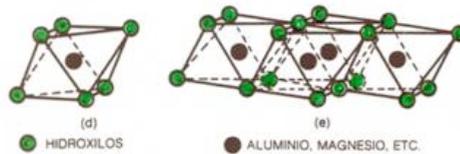


Fig. 2.: Hoja octaédrica de arcilla

La combinación de las hojas tetraédricas entre sí, o con octaédricas genera los distintos tipos de arcillas: tipo 1:1 T-T, tipo 1:1 T-O, tipo 2:1 T-O-T (Véase Fig. 3.). A los arreglos cristalinos se les denomina *capa*, y cuando presentan además un canal

interlaminar, se les denomina *unidades estructurales de la arcilla* (Cruz-Castañeda, 2008).

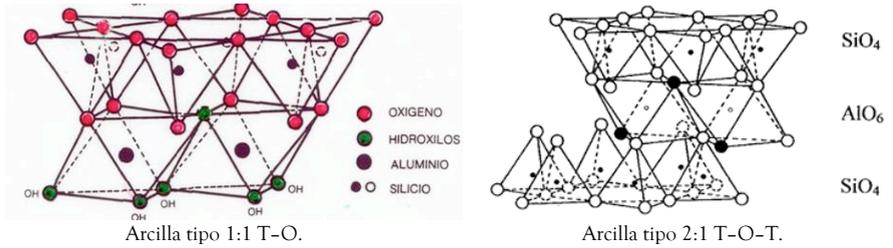


Fig 3.: Tipos de arcillas según su estructura

### i. Montmorillonita de Sodio

En la montmorillonita las capas de arcilla están formadas por una hoja de alumina que comparte átomos de oxígeno con dos hojas de sílica (tipo 2:1 T-O-T). Las capas apiladas paralelamente una sobre otra están separadas por un canal interlaminar, en el que se pueden encontrar distintos tipos de cationes. Las principales fuerzas que unen estas capas entre sí son fuerzas electrostáticas aumentadas por interacciones de tipo van der Waals.

A  $\text{pH} \leq 8$  existen cargas negativas sobre las paredes del canal interlaminar, y cargas positivas en las orillas de los cristales de arcilla (Véase Fig. 4.). Estas cargas son originadas principalmente por sustituciones isomórficas, pero también son debidas a imperfecciones en la estructura cristalina de la arcilla, enlaces rotos en las orillas de las partículas y disociación de grupos hidroxilos (Rao, *et al.*, 1980).

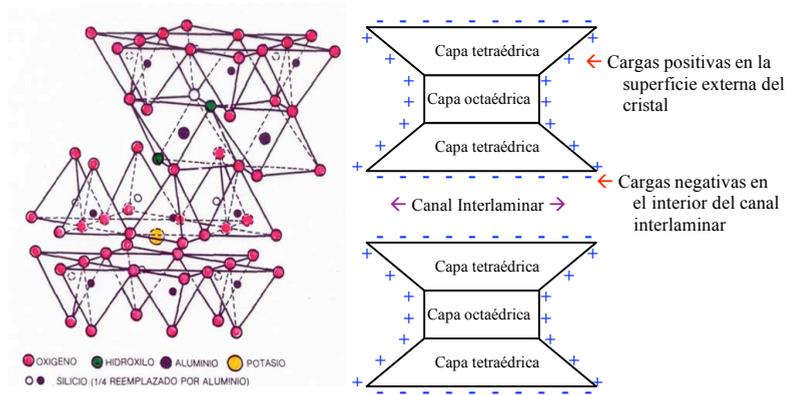


Fig. 4.: Distribución de cargas en la unidad estructural de la montmorillonita de sodio

Las cargas son estabilizadas por cationes metálicos, que en ambientes naturales pueden ser  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{H}_3\text{O}^+$  y son una medida del grado de sustitución isomórfica (Van Olphen, 1977). El catión soluble más abundante es el  $\text{Na}^+$ , lo que hace a la montmorillonita de sodio el arcilla más común (Mosqueira, 1996). En presencia de agua, los contraiones adsorbidos dentro del canal interlaminar pueden ser cambiados fácilmente por otros iones en disolución. A la cantidad de cationes intercambiables expresada en miliequivalentes por 100 g de arcilla seca se le llama capacidad de intercambio catiónico o capacidad base (Guzmán, 2006).

El agua, al igual que algunos compuestos orgánicos, también puede entrar en el canal interlaminar, produciendo un hinchamiento de la arcilla, debido a que ésta no presenta sus láminas unidas por puentes de hidrógeno, por lo que se separan fácilmente (Colín-García, 1999).

Los mecanismos de adsorción de moléculas orgánicas en la montmorillonita, como en el resto de arcillas en general, son una combinación de fenómenos como puentes de hidrógeno, interacciones ión-dipolo, fuerzas de van der Waals, y especialmente intercambio iónico (Lailach, *et al.*, 1968), así como formación de complejos con los contraiones de las arcillas (Van Olphen, 1977). La adsorción es un fenómeno complejo que depende de la naturaleza de la molécula que se adsorbe, su forma (Rao, *et al.*, 1980) y su concentración, del pH total de la solución, de la existencia de metales en la posición intercambiable, de los fenómenos de coadsorción, del tipo de arcilla, de los metales asociados y del número de moléculas de agua presentes (Negrón-Mendoza, *et al.*, 1996).

Los cationes  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , etc., estructurales o intercambiables, dan carácter ácido de Lewis (aceptor de electrones) a la arcilla (Solomon, 1968), mientras que los protones dentro del canal interlaminar le dan carácter de ácido de Bronsted-Lowry (donador de protones) (Negrón-Mendoza, *et al.*, 1996).

## ii. Participación de las Arcillas en la Evolución Química

La síntesis prebiótica de bio-moléculas relevantes, es en cierta manera fácil, como lo ha demostrado, medio siglo de experimentación. Sin embargo, el océano prebiótico contenía una solución diluida de miles de especies de moléculas orgánicas, de las cuales muchas no formaron parte de moléculas de

importancia biológica (Hazen, 2005). Para la formación de compuestos más complejos, fue necesaria la selección, concentración y organización de monómeros dentro de ese medio.

Al considerar los ambientes en donde estas reacciones pudieron tener lugar en la Tierra primitiva, se encuentra que el medio geológico más extendido lo constituyen las interfases. Reacciones de tipo heterogéneo entre minerales y agua, atmósfera/litosfera pudieron ser muy relevantes, teniendo lugar en las orillas de los océanos, en lagunas someras, etc. En estos sitios, los procesos de evaporación/re-hidratación fueron importantes como factores de concentración de compuestos químicos. Estos ambientes geológicos son ricos en minerales con capacidad de adsorber compuestos orgánicos. Entre los minerales los que podrían tener mayor relevancia son sulfuros, carbonatos, silicatos y en particular arcillas.

Debido a la amplia distribución geológica (Negrón-Mendoza y Navarro-González, 1990) y antigüedad de las arcillas, y considerando sus propiedades fisicoquímicas y gran afinidad que poseen por los compuestos orgánicos (Ponnamperuma, *et al*, 1982), en 1951 John D. Bernal propuso por primera vez que los compuestos orgánicos prebióticos pudieron ser adsorbidos en superficies minerales, como las arcillas, y ser concentrados y orientados para favorecer o catalizar ciertas reacciones (Negrón-Mendoza y Navarro-González, 1990), o bien dar protección a los compuestos formados ante las fuentes de irradiación, puesto que el escenario primitivo postula un ambiente con intensa luz UV que eventualmente destruiría cualquier monómero y polímero formado de acuerdo a sus tiempos de vida media y/o reactividad).

Existen numerosos estudios de Evolución Química en los que se han empleado arcillas (especialmente Montmorillonita y Kaolinita), demostrándose que tienen gran capacidad para servir como lugares de síntesis o descomposición de algunos compuestos (como en: Yoshino, *et al.*, 1971; Akabori, 1956; Harvey, *et al.*, 1972; Chittenden y Schwartz, 1976; Harvey *et al.*, 1971), sitios de adsorción para otros (como en: Graf y Lagaly, 1980; Friebele, *et al.*, 1981; Serrato, 1996) y catalizadores poliméricos en algunos casos (como en: Akabori, 1955; Degens, *et al.*, 1970; Negrón-Mendoza, *et al.*, 1992), sin embargo, aún no se conocen los

detalles de los pasos que presenta cada uno de dichos fenómenos (Negrón-Mendoza, *et al.*, 1992).

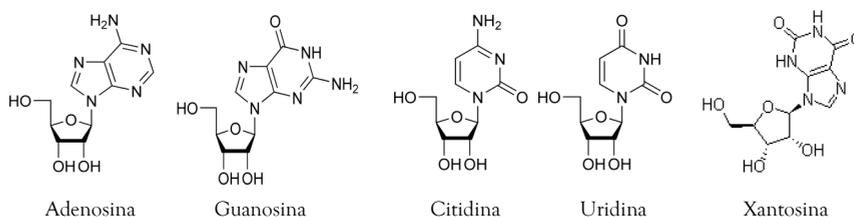
## 2. Los Nucleósidos

Un nucleósido es una molécula monomérica orgánica que resultan de la unión covalente entre una base heterocíclica con una pentosa que puede ser ribosa (ribonucleósidos) o desoxiribosa (desoxiribonucleósidos). La unión se realiza mediante un enlace N-glucosídico  $\beta$  que se establece entre el C<sub>1</sub> de la pentosa y un nitrógeno de la base (el N<sub>1</sub> si es base pirimidínica y N<sub>9</sub> si es base purínica), con la pérdida de una molécula de agua. Pueden combinarse con un grupo fosfórico (ácido fosfórico: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) mediante determinadas quinasas de la célula, produciendo nucleótidos, que son los componentes moleculares básicos del ADN y el ARN, compuestos fundamentales en los estudios evolutivos (Meléndez-López, 2008).

Los nucleósidos son más polares (y por tanto hidrofílicos) que las bases nitrogenadas libres, lo que les otorga mayor solubilidad en agua. Su estabilidad en medio ácido varía dependiendo de su base nitrogenada, siendo los pirimidínicos relativamente estables y los purínicos de fácil hidrólisis (Peña, *et al.*, 2004).

A nivel bioquímico tienen interés como sustancias libres en las vías biosintéticas y degradativas de los ácidos nucleicos.

Para efectos del estudio con arcilla, se seleccionaron 5 nucleósidos: 2 purínicos (adenosina y guanosina), 2 pirimidínicos (citidina y uridina) y la xantósina (Véase Fig. 5.).



*Fig. 5.: Estructura química de los nucleósidos seleccionados para el estudio*

La Adenosina es un nucleósido endógeno sintetizado de la degradación de aminoácidos como metionina, treonina, valina e isoleucina así como de AMP (adenosin monofosfato).

Cumple numerosas funciones en procesos bioquímicos, como la transferencia de energía, en la forma de ATP (adenosín trifosfato) y ADP (adenosín difosfato), así como transductor de señal en la forma de adenosín monofosfato cíclico (AMPC).

La guanosina es un nucleósido importante en ciclos bioquímicos, pues puede ser fosforilada, obteniéndose GMP (guanosín monofosfato), GMPc (guanosín monofosfato cíclico), GDP (guanosín difosfato) y GTP (guanosín trifosfato), todos componentes de rutas metabólicas.

La citidina y la uridina son nucleósidos pirimidínicos que se obtiene de la degradación de alimentos ricos en ARN (ácido ribonucleico), que son absorbidos intactos por el cuerpo humano. Luego de su absorción, la citidina es transformadas en uridina. La uridina participa en ciclos bioquímicos como el de la glicólisis de la galactosa.

#### a. Síntesis Abiótica de Nucleósidos

La síntesis abiogénica de nucleósidos en condiciones prebióticas es una de las más complicadas, tanto así que en el campo de estudio de Origen de la Vida suele conocerse como “El problema nucleósido”, pues representa uno de los más grandes obstáculos en la hipótesis del mundo del ARN y otras teorías.

Hace poco más de treinta años, Leslie Eleazer Orgel y colaboradores lograron la síntesis de adenina, un nucleósido purínico, mediante el calentamiento y la desecación de la base nitrogenada y la ribosa, en presencia de sales metálicas divalentes ( $MgCl_2$  y  $MgSO_4$ ). Sin embargo, el rendimiento es relativamente bajo, obteniéndose productos de unión de la ribosa con el grupo amino de la adenina (Collins, 2005). Además, empleando esta metodología fue imposible obtener guanosina y/o nucleósidos pirimidínicos (aún cuando estos son más solubles que la misma adenina, que era la explicación que se había hallado para la falla de la síntesis con guanina, que es poco soluble en agua). Se ha propuesto que la deslocalización en la carga sobre el  $N_1$  de las bases pirimidínicas, que debe iniciar el ataque nucleofílico al carbón aldehídico de la ribosa, dificulta la formación del enlace glicosídico con las pirimidinas (Collins, 2005).

Se han investigado otras rutas para la obtención de estos compuestos en condiciones prebióticas plausibles, destacándose tres enfoques particulares:

1) La construcción de la base pirimidínica directamente sobre la ribosa por Sánchez y Orgel, en 1970 (Collins, 2005), la cual procede por la adición de cianamida

a la ribosa, que genera un biciclo que reacciona con cianoacetileno para dar  $\alpha$ -citidina (Véase Fig. 6.). La reacción es altamente regioselectiva, dando mínima cantidad de  $\beta$ -citidina. La citidina formada puede ser hidrolizada para dar uridina, lo que señala un camino plausible para obtener ambos nucleósidos. Sin embargo, la síntesis presenta el problema de que produce  $\alpha$ -nucleósidos pirimidínicos y no ha sido encontrado un análogo para la síntesis de nucleósidos purínicos.

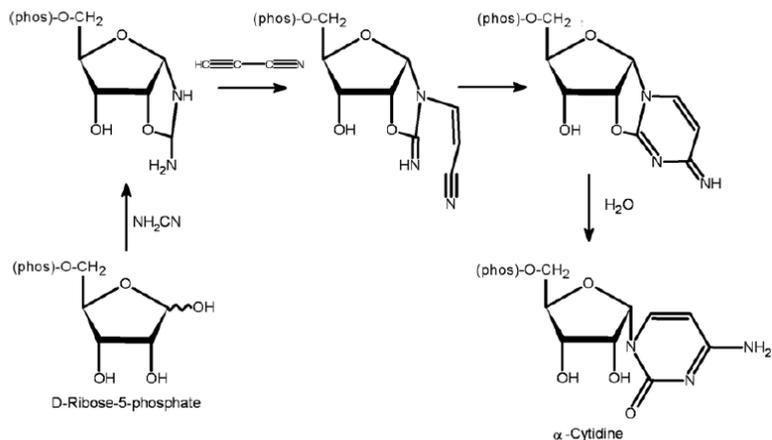


Fig. 6.: Síntesis de  $\alpha$ -citidina por el método reportado por Sánchez y Orgel (1970)

2) La construcción del azúcar sobre la base nitrogenada preexistente, propuesta por Saladino y colaboradores, en 2003 (Collins, 2005), que aún presenta diversos problemas.

3) La utilización de análogos de las bases pirimidínicas que posean el arreglo apropiado de sustituyentes en el anillo heterocíclico que permita incrementar o mantener la densidad electrónica sobre el nitrógeno que realiza el ataque al carbono aldehídico del azúcar. Con ello se esperaría obtener un análogo del nucleósido pirimidínico deseado, aplicando las condiciones que han sido exitosamente empleadas en la síntesis de adenosina. Dicho nucleósido análogo podría ser después químicamente modificado (en las condiciones prebióticas) para obtener el nucleósido pirimidínico puro, o bien, podría haber sido empleado en ese estado análogo hasta que los polímeros catalíticos adecuados evolucionaran lo suficiente como para producir la citidina y uridina actuales (Collins, 2005).

## **B. Objetivos**

### **1. General:**

- Determinar la capacidad de las arcillas para concentrar distintos tipos de nucleósidos y protegerlos ante irradiación gamma en condiciones de pH, concentración de oxígeno y temperatura específicas que simulan un ambiente terrestre primitivo.

### **2. Específicos:**

- Probar la capacidad de la arcilla (montmorillonita de sodio) para adsorber y desorber nucleósidos a distintos valores pH.
- Establecer la influencia de la montmorillonita de sodio en la radiólisis anóxica de cinco nucleósidos.
- Examinar la influencia de la temperatura de desecación en las transformaciones químicas sufridas por los nucleósidos en presencia de arcilla.

## **C. Justificación**

En el estudio de la etapa de evolución química de la Tierra, la comprensión de los procesos físico-químicos que precedieron al origen de la vida y en especial, la elucidación de mecanismos eficientes para la selección, concentración y organización de moléculas simples en macromoléculas bioquímicamente importantes, constituye uno de los retos principales. Una posible forma de enfocar este problema se encuentra en el análisis de minerales como superficies sólidas que pudieran llevar a cabo estas funciones.

Existiendo clara evidencia geológica de la presencia de arcillas durante el período de evolución prebiótica y teniendo en cuenta sus características estructurales, se les puede considerar candidatas perfectas para un estudio de este tipo.

En vista de lo anterior, y de que la interacción entre minerales y radiación ionizante ha sido un tema poco explorado, tanto en trabajos de química de radiaciones como en investigaciones de origen de la vida, donde los estudios suelen enfocarse en las arcillas como agentes catalíticos, esta investigación pretende probar la hipótesis del papel concentrador y protector que las arcillas, representadas por la montmorillonita de sodio, pudieron haber

jugado para compuestos orgánicos como los nucleósidos, al ser expuestos a fuentes externas de radiación ionizante.

La importancia de esta propuesta de investigación radica en analizar la interacción entre el mineral y un tipo específico de moléculas prebióticas de gran importancia biológica, dentro de un escenario geológico plausible y acorde con la información actual.

#### **D. Hipótesis**

Las arcillas pudieron actuar como superficies concentradoras y protectoras de moléculas orgánicas como los nucleósidos durante el período de evolución química de la Tierra, resguardándolas de la descomposición que sufrirían al ser expuestas a radiación gamma por un período prolongado.

### III. Materiales y Métodos

#### A. Materiales

##### 1. Reactivos

- Nucleósidos grado reactivo (99%), SIGMA: Adenosina, Guanosina, Citidina, Uridina, Xantosina.
- Bases Nitrogenadas: Adenina (99%, SIGMA), Guanina (98%, Aldrich), Citosina (99%, SIGMA), Uracilo (cristalino, SIGMA), Xantina (99-100%, SIGMA-Aldrich).
- Montmorillonita de Sodio (SWy-1, obtenida del Depósito de Minerales Arcillosos de Clay Minerals Society Source en el Departamento de Geología de la Universidad de Missouri, Columbia, USA).
- HCl concentrado grado reactivo (38.4%, Baker Analyzed)
- NaOH<sub>(s)</sub> en lentejas para análisis (99%, Merck)
- Acetato de sodio anhidro para análisis (Merck)
- Metanol grado HPLC (Burdick & Jackson ACS/HPLC Certified Solvent)
- Argón<sub>(g)</sub>
- Agua tridestilada (obtenida utilizando el método de Donnell y Sangster, 1970. Véase Anexo A)

##### 2. Equipo Analítico

- Material ordinario de laboratorio: vasos de precipitados, balones aforados, micropipetas, pipetas, erlenmeyers, tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca, tubos para centrifuga, espátulas, mangueras, pinzas, gradillas, papel parafilm, papel pH, etc..
- Equipo de filtración para los disolventes del cromatógrafo HPLC (membranas de Nylon 66, de 0.45µm x 47mm, 08D01604, SUPELCO).
- Irradiador gamma (Gammabeam 651) con fuente de Co-60.
- Instrumental analítico:
  - Balanza analítica (Adventurer, Ohaus)
  - Horno desecador (Single-Wall Transit Oven, BlueM Electric Company)
  - Horno de Vacío (Squaroid, Lab-Line)
  - Agitador vortex (Cole-Parmer touch Mixer, model 4721-20)
  - Agitador 3D (Multi Tube Rotator, Lab-Line)

- Centrifuga (Beckman Coulter, Allegra 64R)
- Espectrofotómetro Varian Cary 100 Scan UV-vis
- Cromatógrafo de líquidos HPLC (Perkin-Elmer Series 200 lc pump / Varian 9050 Variable Wavelength UV-vis Detector)

## B. Procedimiento Experimental

### 1. Lavado de Cristalería

Toda la cristalería no volumétrica fue lavada aplicando el protocolo para eliminación de materia orgánica (Albarrán, G., 1982; Draganič y Draganič, 1971):

- Se lavó con jabón y agua todo el material.
- Se sumergió la cristalería en mezcla sulfonítrica caliente ( $\text{HNO}_3$  fumante /  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, 1:3) por 3 horas.
- Se enjuagó la cristalería con agua corriente, agua destilada y agua tridestilada.
- Se empacó la cristalería en papel aluminio y secó en una mufla a  $300^\circ\text{C}$  por 24 horas.

### 2. Preparación de Disoluciones de Nucleósidos y Bases Nitrogenadas

Se prepararon disoluciones acuosas de los nucleósidos en concentración  $1\text{E}^{-2}$  M, aplicando calor moderado para facilitar el proceso. En el caso de la adenosina, guanosina y xantosina fue necesario agregar NaOH diluido para lograr la disolución.

De las anteriores se tomaron las alícuotas necesarias para preparar disoluciones de concentración  $1\text{E}^{-3}$  M, cuyos pH se ajustaron antes de aforar, de acuerdo a la prueba a efectuarse.

Todas las disoluciones fueron almacenadas en un refrigerador a  $10^\circ\text{C}$ .

### 3. Análisis de Disoluciones Patrón

Se analizaron, mediante dos técnicas, las disoluciones de concentración  $1\text{E}^{-3}$  M:

#### a. Espectroscopia UV-vis

Se efectuó un barrido de absorbancias entre 200 y 800 nm, para determinar la longitud de onda del máximo de absorción de cada nucleósido.

#### b. Cromatografía HPLC

Se determinaron las condiciones adecuadas para separar cada nucleósido de su base nitrogenada, ensayando distintas columnas, solventes y flujos, hasta encontrar la

adecuada: 20  $\mu\text{L}$  de la muestra, columna Ultra IBD (Resteck®), detector de UV ajustado a  $\lambda = 240\text{nm}$ , mezcla de Acetato de Sodio 0.02M/Metanol 80% en proporciones (98:2) como fase móvil, flujo de 1 mL/min.

Adicionalmente se evaluó la estabilidad de los nucleósidos a las condiciones de pH de los experimentos, para descartar que éstas pudieran modificar los resultados independientemente. Para ello se prepararon disoluciones con pH entre 2 y 10 y se les monitoreó durante 12 días mediante HPLC.

#### 4. Pruebas de Adsorción

Se construyeron las curvas de adsorción para cada nucleósido, haciendo la gráfica del porcentaje de nucleósido adsorbido en la arcilla contra el tiempo de agitación que se empleó para adsorberlo. Estos porcentajes fueron calculados a partir de los datos obtenidos, mediante espectrofotometría UV-vis, de la concentración del nucleósido en disolución antes y después de ponerla en contacto con la arcilla. El procedimiento se repitió para cada nucleósido, por triplicado, a dos distintos pH (2 y 6), efectuando la siguiente secuencia:

- Se pesó  $0.1000 \pm 0.0003$  g arcilla en polvo.
- Se prepararon 9 tubos de ensayo para centrifuga agregándoles 3 mL de disolución de un nucleósido.
- Se adicionó la arcilla pesada a 8 de los tubos y se les agitó 5 seg en un vortex (al noveno tubo no se le agregó arcilla y se usó como control).
- Se midió la acidez de la disolución y se reajustó a un pH particular con HCl o NaOH.
- Se agitó 20 seg más en el vortex y luego cada tubo se colocó en un agitador 3D durante 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 min, respectivamente.
- Tras la agitación, se centrifugaron los tubos a 21,000 G durante 35 min.
- Se midió la absorbancia de los sobrenadantes por espectrofotometría UV-vis, determinando el porcentaje de nucleósido adsorbido en cada caso.

Se efectuaron análisis por HPLC de las muestras, y con las áreas de los picos de cada nucleósido antes y después de la adsorción se calcularon los porcentajes de adsorción nuevamente. Se compararon estos porcentajes con los calculados por el análisis espectrofotométrico y se estableció el intervalo típico de porcentajes del proceso de adsorción en las condiciones más favorables.

#### a. Análisis por Difracción de Rayos X

Se efectuaron análisis de rayos X de difracción de polvos a las arcillas que adsorbieron los nucleósidos en el experimento anterior, con el fin de determinar el lugar de adsorción. Para ello se les secó en horno a 25°C y se les molió mecánicamente en un mortero. Los análisis fueron efectuados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la UNAM. (Para detalles sobre el método empleado, Véase Anexo B)

### 5. Pruebas de Desorción

Se observó cualitativamente, mediante espectrofotometría UV-vis, la capacidad del arcilla para desorber los nucleósidos a distintos pH (2, 5, 8 y 12). Con los resultados de estos ensayos se seleccionó los valores de acidez más apropiados y se realizó una semi-cuantificación, calculando el porcentaje del compuesto desorbido en relación al adsorbido, medido en términos del área de los picos registrados por HPLC. El procedimiento se repitió para cada muestra, por triplicado, efectuando la siguiente secuencia:

- Se adsorbió cada nucleósido en arcilla (usando las condiciones más favorables determinadas con las curvas de adsorción) y se descartó el sobrenadante.
- Se agregó 3 mL de agua tridestilada (previamente ajustada a uno de los pH seleccionados) a la arcilla sedimentada en cada tubo.
- Se agitó cada tubos por 5 seg en un vortex, se reajustó el pH y se agitó 20 seg más.
- Cada tubo se colocó en un agitador 3D por 45 min y se centrifugó durante 35 min a 21,000 G.
- Se midió la absorbancia de los sobrenadantes por espectrofotometría UV-vis.

Se practicó el proceso completo de desorción a una muestra de arcilla sin nucleósido, para analizarla como blanco (tanto por espectrofotometría UV-vis como por cromatografía de líquidos).

De las desorciones efectuadas a pH 5 y 8 se efectuaron análisis por HPLC, calculándose, a partir de las áreas de los picos de cada nucleósidos, el porcentaje relativo desorbido.

Se compararon los porcentajes relativos de las desorciones a pH 5 y 8 de muestras de nucleósidos desorbidas inmediatamente contra los calculados para muestras desorbidas

después de 7 días de adsorbidas (se mantuvo la arcilla en contacto con la solución de nucleósido todo el tiempo).

## 6. Experimentos de Irradiación

Se examinó la capacidad de la arcilla para proteger a los nucleósidos de la descomposición inducida por radiación ionizante. Para ello se determinó primero la curva de descomposición de cada nucleósido en ausencia de arcilla, exponiendo las disoluciones a una fuente de Co-60 (rayos  $\gamma$ ) durante lapsos variables y haciendo la gráfica de concentración del nucleósido (medida espectrofotométricamente en términos de absorbancia) contra tiempo de irradiación. Así mismo, la descomposición de las muestras se monitoreó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), calculándose, a partir de las áreas de los picos de cada nucleósidos y base nitrogenada formada, los porcentajes relativos presentes en las muestras.

El tratamiento general de cada muestra fue el siguiente:

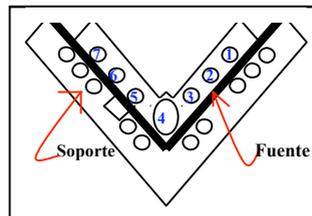
- Se tomaron 3 mL de cada nucleósido y se colocaron en tubos de ensayo.
- Se burbujó argón dentro de las disoluciones durante 5 min (con ayuda de una micropipeta limpia para cada uno) y se taparon inmediatamente los tubos de ensayo, evitando que entrara oxígeno en las muestras.
- Se colocó cada tubo en una posición específica de la cámara del irradiador (siempre la misma para cada nucleósido) y se expusieron a la fuente de Co-60 durante un período determinado (30 min, 1, 2, 4 y 5 hrs). Cada posición seleccionada en el irradiador presenta una intensidad de dosis específica (Véase Tabla 2., Fig. 7.), cuantificada por la Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM, mediante el método de Fricke Modificado (Perezgasga, *et al.*, 1988; Treviño, *et al.*, 1987).

**Tabla 2.:** Intensidad de dosis de irradiación en la cámara del Gammabeam 651

Posición	Nucleósido	Intensidad de Dosis (Gy/min)
1	Adenosina	186 - 176.1*
2	Guanosina	181 - 171.3*
5	Citidina	173.1 - 163.9*
6	Uridina	174.9 - 165.6*
7	Xantosina	170.2 - 161.2*

\*Mayo 2009 - Octubre 2009

**Fig. 7.:** Esquema de la disposición de las muestras dentro de la cámara del irradiador



Después se ensayó irradiar los nucleósidos adsorbidos en arcilla, exponiéndolos el tiempo determinado en el experimento anterior como necesario para destruirlos completamente en ausencia del mineral. Tras desorberlos, el sobrenadante fue analizado mediante HPLC para establecer si los compuestos sobrevivieron a la irradiación.

El tratamiento de estas muestras fue:

- Se adsorbieron los nucleósidos en las condiciones establecidas como óptimas en las curvas de adsorción.
- Se burbujó argón dentro de las disoluciones durante 5 min (con ayuda de una micropipeta limpia para cada uno) y se taparon inmediatamente los tubos de ensayo, evitando que entrara oxígeno en las muestras.
- Se colocó cada nucleósido dentro de la cámara del irradiador en la misma posición que en el experimento anterior, y se expusieron a la fuente de Co-60 durante 5 hrs (dosis promedio = 51.699 KGy).
- Se retiraron los tubos de la cámara y se agitaron en el vortex durante 30 seg.
- Se trasladó cada muestra a un tubo de plástico para centrifuga y se les centrifugó durante 35 min a 21,000 G.
- Se eliminó el líquido sobrenadante de los tubos y se efectuó el procedimiento de desorción al pH y en las condiciones establecidas como adecuadas en el experimento de desorciones.
- Los productos desorbidos se centrifugaron 35 min a 21,000 G y se separaron los sobrenadantes, descartándose las arcillas.
- Se analizaron los sobrenadantes por HPLC.

Se practicó el proceso completo de irradiación y desorción a una muestra de arcilla sin nucleósido, para analizarla como blanco.

## 7. Experimentos de Desecación

Se ensayó, por triplicado, la estabilidad de los nucleósidos adsorbidos en la arcilla, al someterse ésta a desecación a distintas temperaturas. Para ello:

- Se adsorbió cada nucleósido en arcilla y se descartó el sobrenadante.
- Se secó la arcilla en horno a distintas temperaturas: 22°C (en horno de vacío), 30° y 60°C (en horno de convección).
- Se efectuó la desorción al pH más adecuado.

- Se analizaron los sobrenadantes obtenidos por HPLC, calculándose, a partir de las áreas de los picos de cada nucleósido y base nitrogenada formada, los porcentajes relativos presentes en las muestras.

Se realizó el proceso completo a las tres temperaturas a muestras de arcilla sin nucleósido, para analizarlas como blanco.

## VI. Resultados

### A. Análisis de Soluciones Patrón:

#### 1. Máximos de absorción de nucleósidos: análisis por espectrofotometría UV-vis

La tabla 3 señala las longitudes de onda máximas para cada nucleósido a pH 2 (pH utilizado en estudios anteriores para el proceso de adsorción), encontradas mediante curvas de absorción como la de la figura 8, que se emplearon en los análisis posteriores.

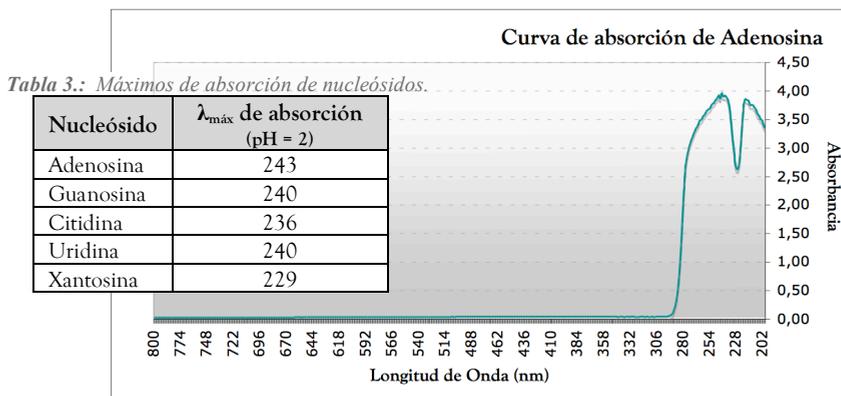


Fig. 8.: Curva de absorción de adenosina.

Fuente: datos experimentales.

#### 2. Estabilidad de los nucleósidos en disolución a valores de pH entre 2 y 10: análisis por HPLC

En los incisos a., b. y c. de la figura 9 se muestran los cromatogramas de disoluciones  $1\text{E}^{-3}$  M de adenosina a tres distintos pH monitoreadas durante 12 días. Éstas ejemplifican los resultados obtenidos para cada nucleósido en estudio.

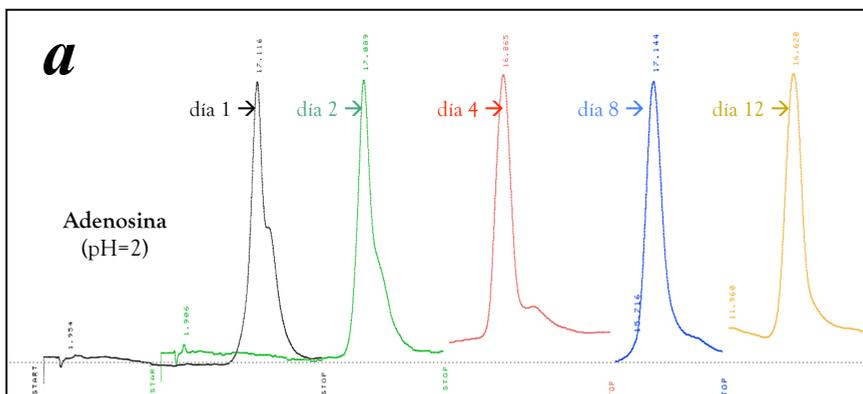
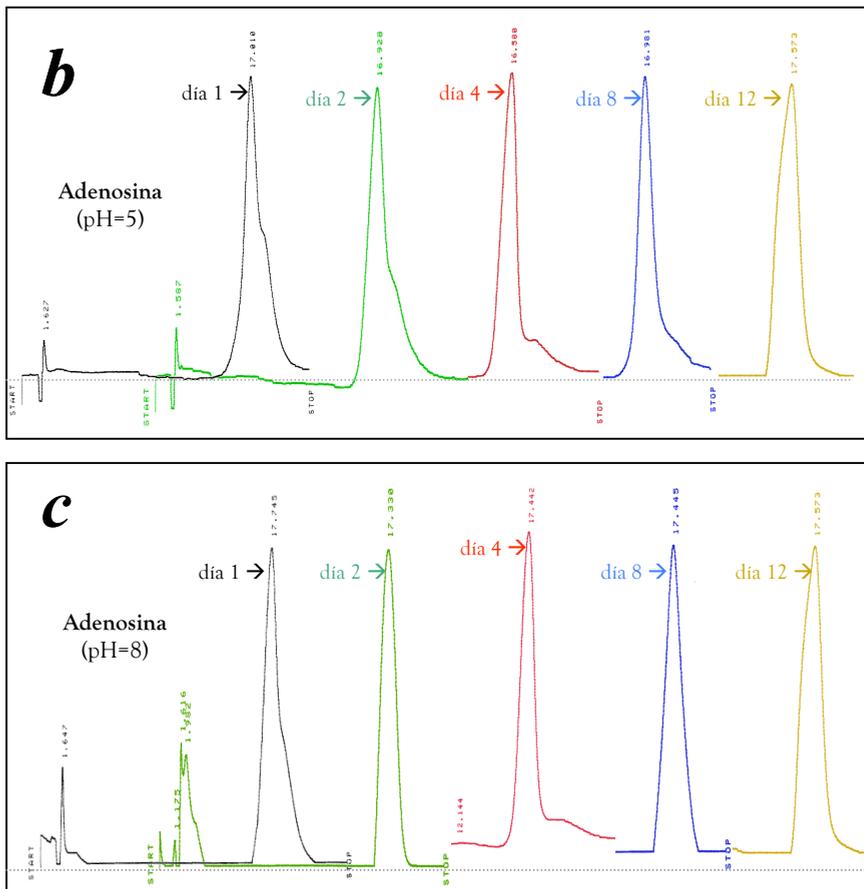


Fig. 9. Continúa...



*Fig. 9.: Análisis por HPLC de la estabilidad de la adenosina a tres pH durante 12 días:  
a) Disolución a pH=2, b) Disolución a pH=5, c) Disolución a pH=8.*

Fuente: datos experimentales.

Los datos de los cromatogramas anteriores y sus equivalentes para el resto de nucleósidos en el estudio se procesaron para obtener las gráficas de los incisos a. a e. de la *figura 10*. En ellas se presentan las curvas de estabilidad de los cinco nucleósidos en disoluciones de pH entre 2 y 10, monitoreadas durante 12 días por HPLC. Los datos fueron calculados sobre los porcentajes relativos de área de pico de nucleósido en cada cromatograma, tomando el porcentaje del pico de nucleósido de la primera medición (“día 1”) como 100%, y haciendo referencia a éste para calcular los de los siguientes días.

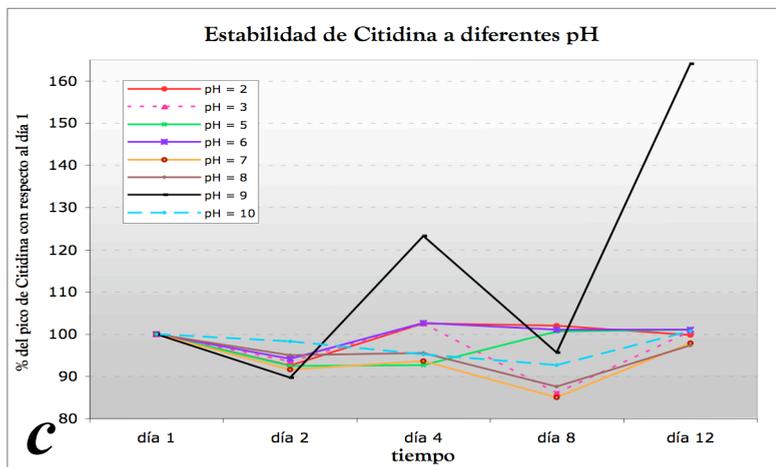
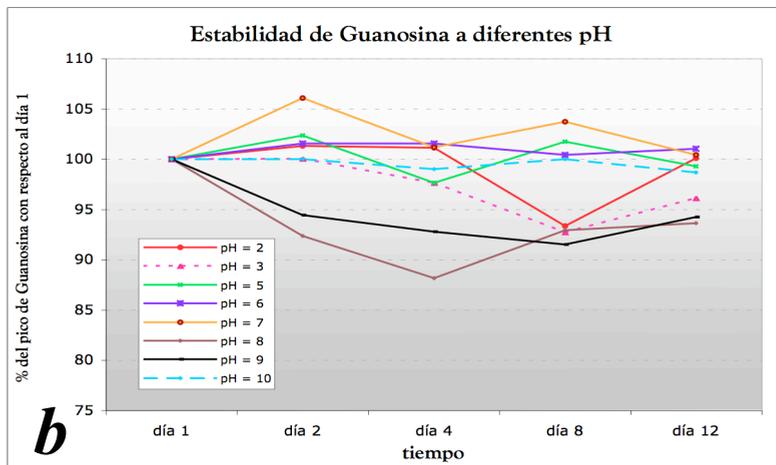
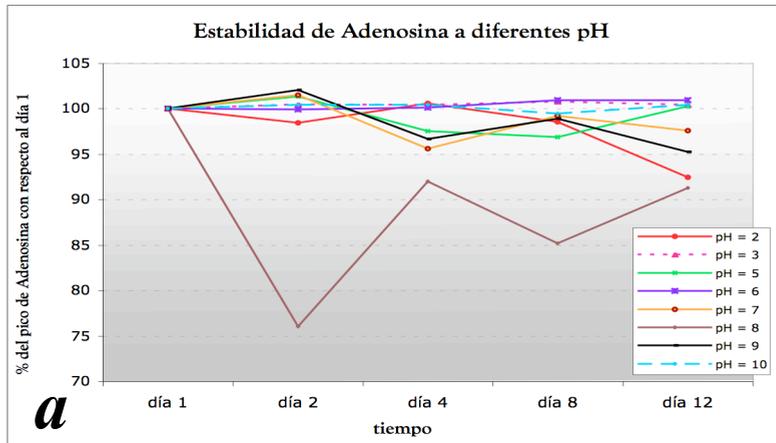


Fig. 10. Continúa...

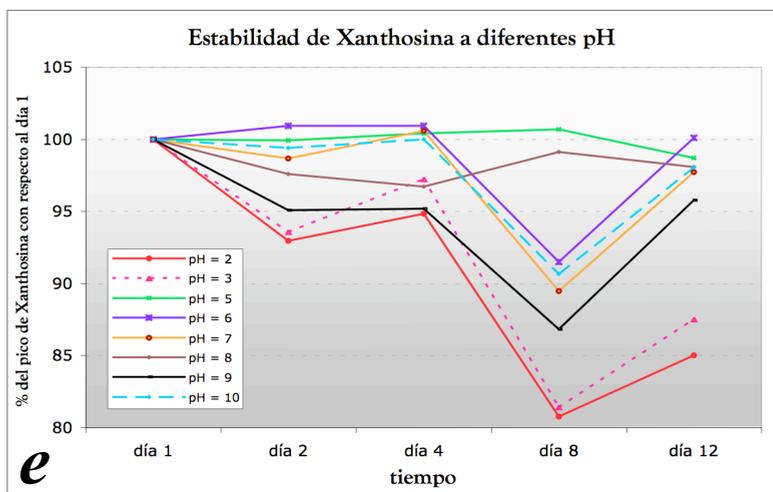
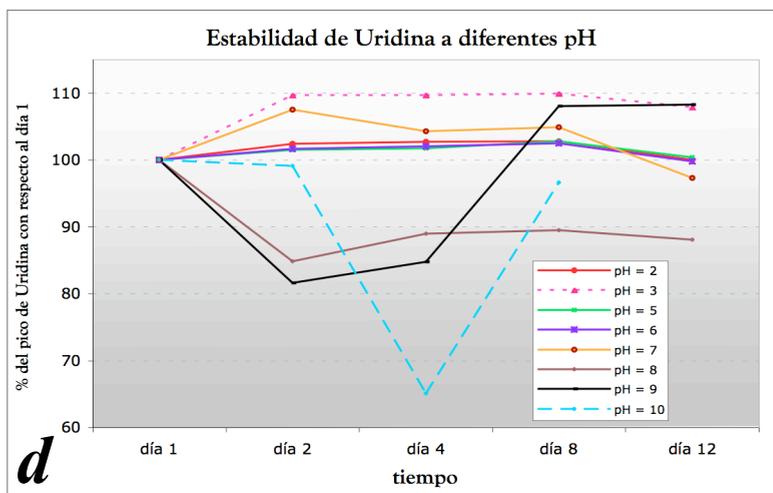


Fig. 10.: Curva de estabilidad de nucleósidos a pH entre 2 y 10 durante 12 días: a) Adenosina, b) Guanosina, c) Citidina, d) Uridina, e) Xantrosina.

Fuente: datos calculados sobre experimentales.

Para todos los nucleósidos se observa que la estabilidad a pH ácido y neutro (siempre superior al 80.8%) es mayor que a pH básico (arriba de 65.1%) conforme pasa el tiempo. Durante el período monitoreado no se detectan, como productos de descomposición, cantidades medibles de las bases nitrogenadas correspondientes a cada nucleósido.

En algunas gráficas, como las de la guanosina y citidina se observan picos a pH básico que superan notoriamente el “100%” de la absorbancia esperada para el nucleósido. Éstos se atribuyen a la probable formación de aductos del nucleósido con grupos OH del medio alcalino, que serían compuestos con coeficientes de extinción más altos que podrían presentar el mismo tiempo de retención que los nucleósidos (o muy cercano), por lo que aparecerían dentro del mismo pico sin separarse.

El que los picos oscilen se relacionaría con equilibrios entre las especies formadas y la original, así como variaciones en las mediciones experimentales.

Se analizaron disoluciones de nucleósidos a pH 2 almacenadas en refrigeración por periodos cercanos a un año y se observó hidrólisis parcial de las muestras (se identificó la base nitrogenada correspondiente), que sin embargo, aún contenían más del 60% del analito original.

### 3. Separación de nucleósidos y bases nitrogenadas: HPLC de una mezcla

En la *figura 11* se muestra el cromatograma obtenido por HPLC de los nucleósidos y sus bases nitrogenadas, separadas empleando las condiciones encontradas experimentalmente como más favorables, e identificados con la ayuda de soluciones estándar.

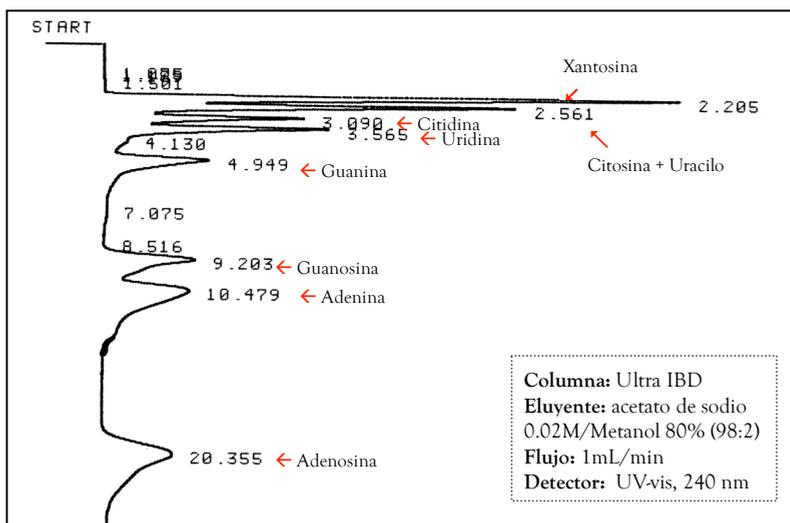


Fig. 11.: Separación de nucleósidos y sus bases nitrogenadas: HPLC de una mezcla.

Fuente: datos experimentales.

## B. Pruebas de Adsorción:

### 1. Curva de adsorción de nucleósidos a distintos pH: análisis por espectrofotometría UV-vis

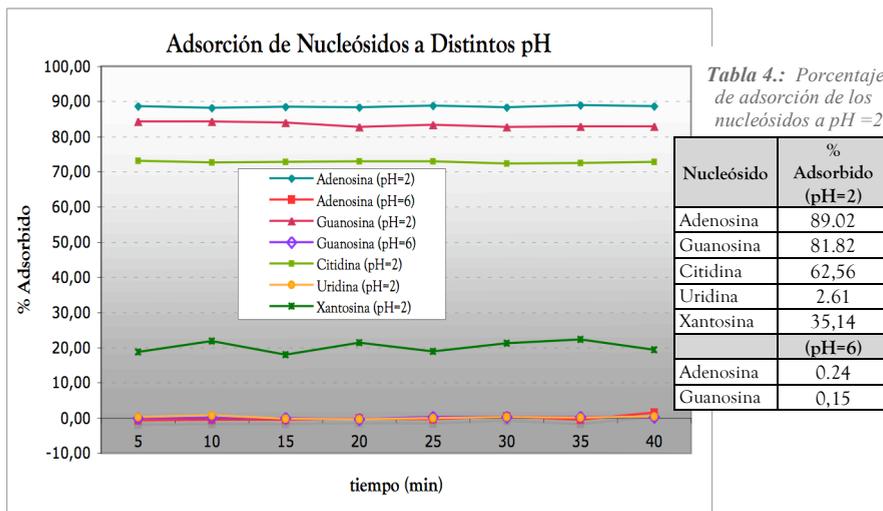


Fig. 12.: Curva de adsorción de nucleósidos a pH 2 y 6.

Fuente: datos calculados sobre experimentales.

En la figura 12 se muestran los porcentajes adsorbidos en la arcilla de los cinco nucleósidos, conforme se incrementa el tiempo de contacto entre el mineral y la disolución a pH 2. Así mismo se muestran los resultados del mismo experimento a pH 6 para la adenosina y la guanosina.

En todos los casos el estudio cinético indica que el porcentaje máximo de adsorción se alcanza desde los primeros 10 minutos de contacto, y que es sumamente bajo a pH 2 para la uridina, y prácticamente cero para los nucleósidos a pH 6. Los nucleósidos purínicos (adenosina y guanosina) son adsorbidos en mayor porcentaje que los pirimidínicos (citidina y uridina).

En la tabla 4 se presentan los porcentajes de adsorción promedio de cada nucleósido, calculados de los obtenidos durante todos los experimentos realizados con arcilla, en los que se observaron variaciones en el porcentaje adsorbido.

## 2. Sitio de adsorción de los nucleósidos dentro de la estructura tridimensional de la montmorillonita de sodio: *análisis por difracción de rayos X de polvos*

En los incisos *a.* a *f.* de la *figura 6* se muestra el segmento característico del espectro de difracción de rayos X de la montmorillonita de sodio, el cual señala la apertura del canal interlamilar de la estructura tridimensional de esta arcilla. En cada gráfica se compara el corrimiento del pico patrón de arcilla pura contra el obtenido de arcilla en la que se adsorbió un nucleósido en particular. Se muestran los espectros de las arcillas con nucleósidos adsorbidos a pH 2, por haberse hallado éste como más favorable para el proceso. Con la intención de confirmar la escasa adsorción de la adenosina a pH 6, se muestra también su espectro, en el que el corrimiento del pico patrón es pequeño comparado con el que ocurre en el experimento a pH=2, porque éste se relaciona directamente con la cantidad de material que entra dentro del canal interlamilar de la arcilla.

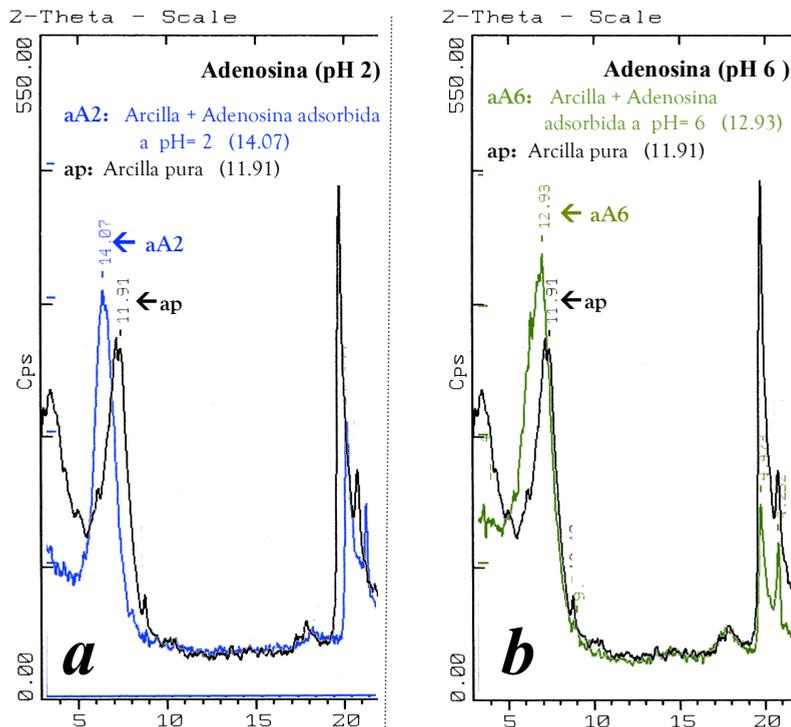
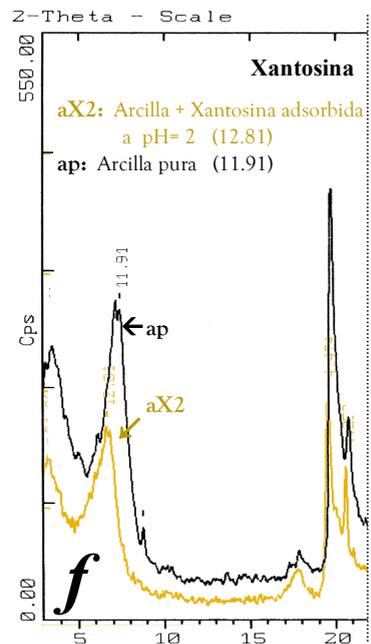
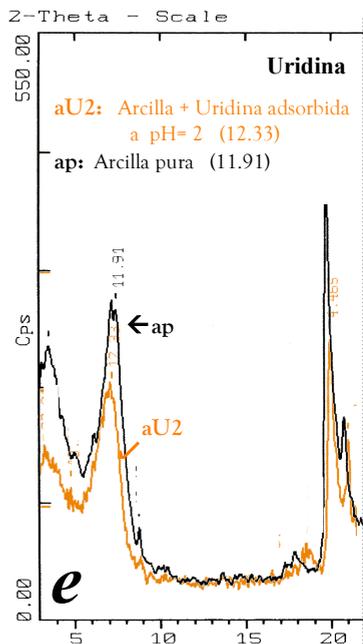
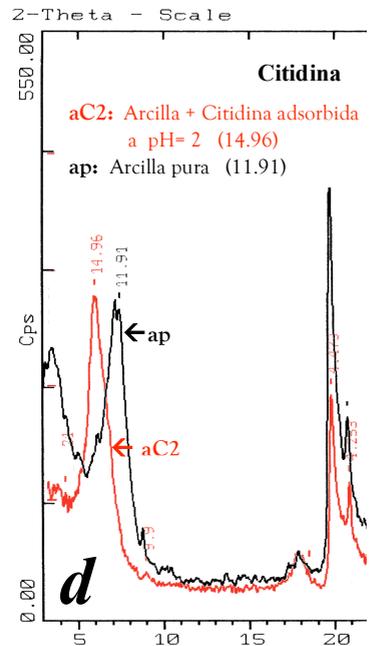
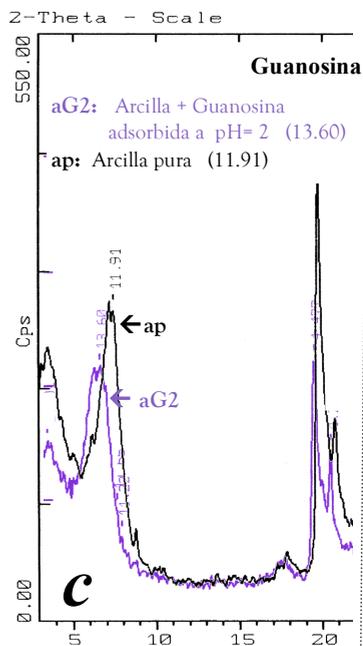


Fig. 13. Continúa...



**Fig. 13.:** Espectro de difracción de rayos X de nucleósidos adsorbida en arcilla: a) Adenosina adsorbida a pH=2, b) Adenosina adsorbida a pH=6, c) Guanosina adsorbida a pH=2, d) Citidina adsorbida a pH=2, e) Uridina adsorbida a pH=2, f) Xantossina adsorbida a pH=2.

Fuente: datos experimentales.

## C. Pruebas de Desorción:

### 1. Porcentajes relativos de desorción y descomposición de nucleósidos a distintos pH: *análisis por espectrofotometría UV-vis y HPLC*

Se ensayó la desorción de los nucleósidos a pH 2, 5, 8 y 12. A pH 2 no se consigue extraer nada, y a pH 12 se observa descomposición de los nucleósidos.

Como se muestra en la *figura 14*, a pH 5 y 8 sí ocurre desorción. Los porcentajes fueron calculados sobre las áreas del pico de nucleósido, registradas en cada cromatograma, aplicando la siguiente fórmula:

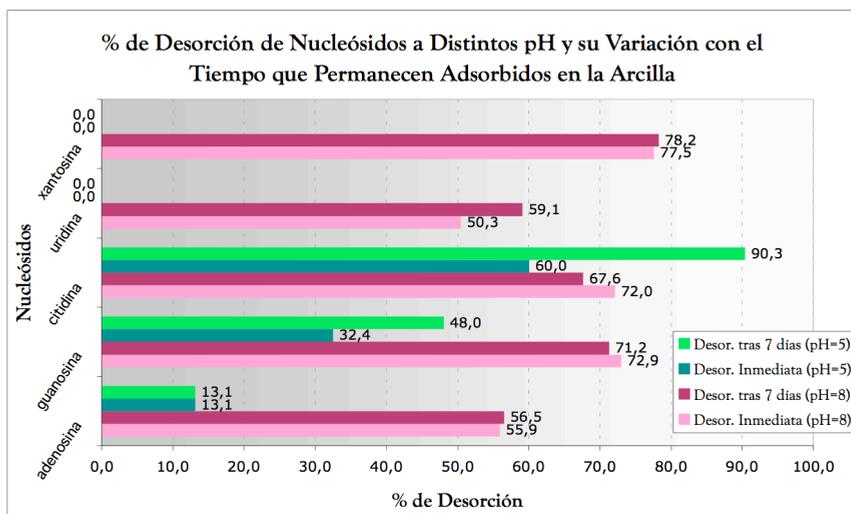
$$\% \text{ Desorbido} = [A_{N_{\text{desorbido}}} / (A_{N_{\text{est}}} - A_{N_{\text{no adsorb}}})] \times 100$$

Donde,

$A_{N_{\text{desorbido}}}$  = área de pico de nucleósido desorbido

$A_{N_{\text{est}}}$  = área de pico de estándar de nucleósido

$A_{N_{\text{no adsorb}}}$  = área de pico de nucleósido no adsorbido



*Fig. 14.: Porcentaje de desorción de nucleósidos a pH 5 y 8 y su variación con el tiempo que permanecen adsorbidos.*

Fuente: datos calculados sobre experimentales.

Las desorciones pasados 7 días se realizaron de arcillas que permanecieron en contacto con la solución de nucleósido todo el tiempo.

Los nucleósidos xantósina y uridina no se pudieron extraer a pH = 5 (%D = 0).

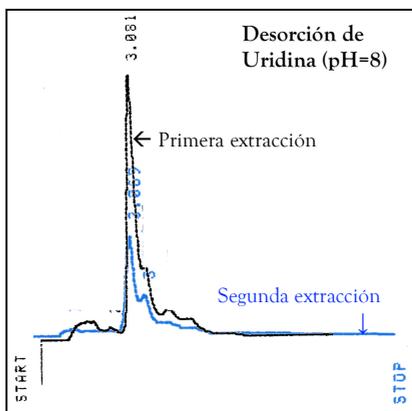


Fig. 15.: Desorción de uridina: análisis por HPLC de primera y segunda extracción.

Fuente: datos experimentales.

Se observó por HPLC que una segunda extracción a pH=8 permite recuperar una pequeña cantidad de nucleósido que no haya salido de la arcilla en la primera, tal como se muestra en la figura 15 para el caso de la uridina. Los porcentajes de recuperación en la segunda extracción son altamente variables entre los nucleósidos.

## D. Experimentos de Irradiación:

### 1. Curva de descomposición de nucleósidos en ausencia de arcilla: análisis por espectrofotometría UV-vis y HPLC

En la figura 16 se muestra la curva de descomposición de cada disolución de nucleósido al ser irradiada durante distintos períodos de tiempo. Se observa, en términos de la variación de la absorbancia, que exceptuando la uridina, todos los nucleósidos examinados resisten sin mayor cambio la radiación hasta un período de casi dos horas, tras el cual decaen rápidamente.

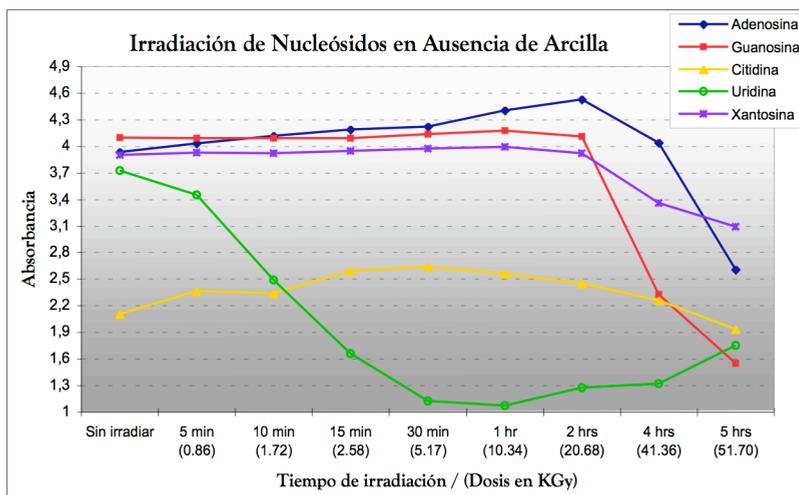


Fig. 16.: Irradiación de nucleósidos en ausencia de arcilla: curva de descomposición.

Fuente: datos experimentales.

En los incisos a. a f. de la figura 17 se ejemplifican, para la adenosina y citidina, los resultados obtenidos por HPLC para el experimento anterior de irradiación de nucleósidos en ausencia de arcilla. Se observa cómo ambas se descomponen en sus bases nitrogenadas y otros productos conforme se irradian durante más tiempo, siendo notoriamente más lábil la citidina (nucleósido pirimidínico) que la adenosina (nucleósido purínico). No se identificaron ni cuantificaron los picos correspondientes a otros subproductos de la radiólisis fuera de las bases nitrogenadas, ya que ésto se salía de los objetivos del estudio, sin embargo, se plantea que se trata de aductos de los nucleósidos con radicales OH formados por la radiólisis del agua, además de fragmentos de descomposición del sustrato.

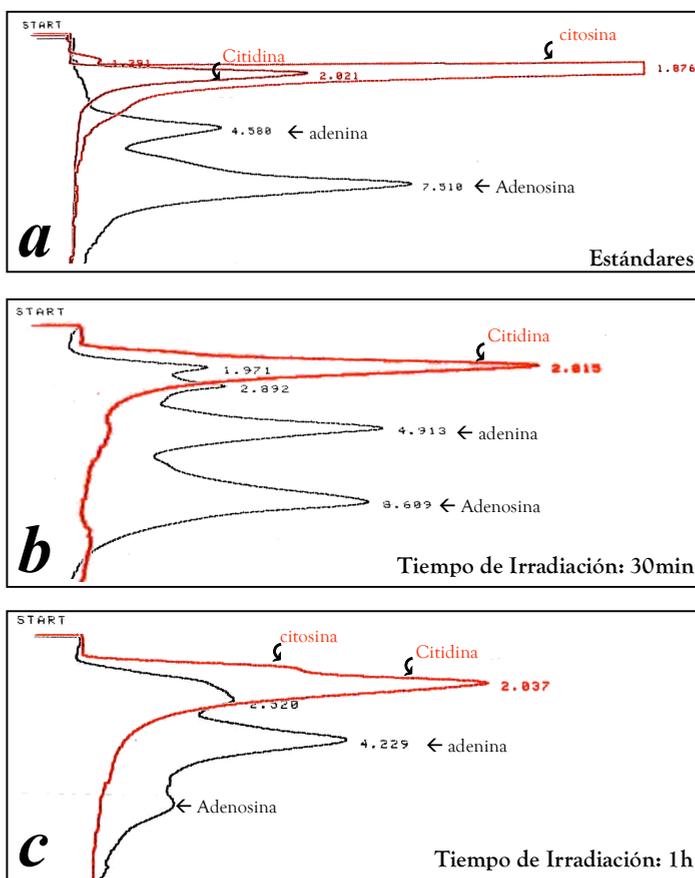


Fig. 17. Continúa...

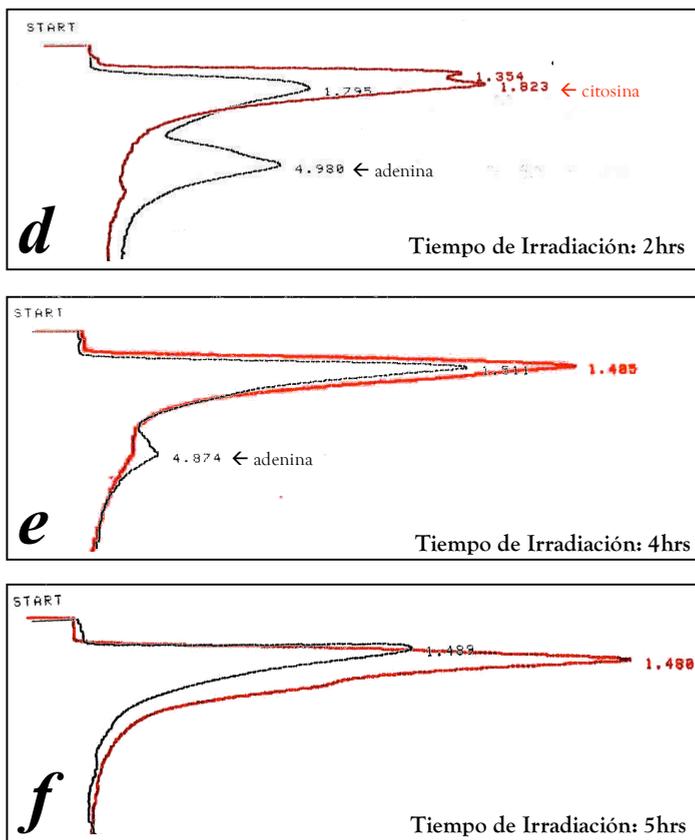


Fig. 17.: Análisis por HPLC de adenosina y citidina irradiados en ausencia de arcilla:  
 a) Estándar de nucleósidos y sus bases nitrogenadas sin irradiar,  
 b) Disolución de nucleósidos irradiada 30 min (dosis = 5.17 KGy),  
 c) Disolución de nucleósidos irradiada 1 h (dosis = 10.34 KGy),  
 d) Disolución de nucleósidos irradiada 2 hrs (dosis = 20.68 KGy),  
 e) Disolución de nucleósidos irradiada 4 hrs (dosis = 41.36 KGy),  
 f) Disolución de nucleósidos irradiada 5 hrs (dosis = 51.70 KGy).

Fuente: datos experimentales.

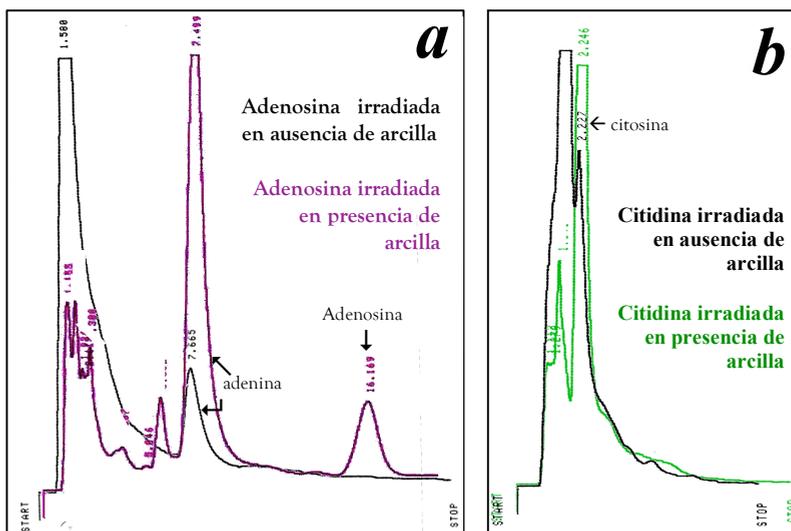
La tabla 5 muestra los porcentajes relativos de nucleósido y su base nitrogenada correspondiente presentes en cada punto de la curva de descomposición medido. Fueron calculados sobre las áreas relativas de los picos en los cromatogramas obtenidos por HPLC (como los mostrados en los incisos a. a f. de la figura 17), considerando el área del pico de estándar sin irradiar como 100%. El porcentaje restante corresponde a otros productos de radiólisis, posiblemente aductos de  $\cdot\text{OH}$  en diferentes posiciones del anillo base y fragmentos del sustrato original.

**Tabla 5.:** Porcentajes de nucleósidos y bases nitrogenadas presentes a distintos tiempos de irradiación en ausencia de arcilla

Muestra	Tiempo de Irradiación / Dosis (KGy)	% de Nucleósido	% de Base Nitrogenada
Adenosina (1E <sup>3</sup> M)	30 min / 5.17	44	33
	1 h / 10.34	20	49
	2 hrs / 20.68	0	44
	4 hrs / 41.36	0	19
	5 hrs / 51.70	0	0
Guanosina (1E <sup>3</sup> M)	30 min / 5.17	99	0
	1 h / 10.34	47	53
	2 hrs / 20.68	0	100
	4 hrs / 41.36	0	0
	5 hrs / 51.70	0	0
Citidina (1E <sup>3</sup> M)	30 min / 5.17	100	0
	1 h / 10.34	76	24
	2 hrs / 20.68	0	15
	4 hrs / 41.36	0	0
	5 hrs / 51.70	0	0
Uridina (1E <sup>3</sup> M)	30 min / 5.17	3	97
	1 h / 10.34	0	0
	2 hrs / 20.68	0	0
	4 hrs / 41.36	0	0
	5 hrs / 51.70	0	0
Xantosina (1E <sup>3</sup> M)	30 min / 5.17	100	0
	1 h / 10.34	100	0
	2 hrs / 20.68	100	0
	4 hrs / 41.36	0	100
	5 hrs / 51.70	0	0

Fuente: datos calculados sobre experimentales.

## 2. Descomposición de nucleósidos en presencia de arcilla: análisis por HPLC



**Fig. 18.:** Descomposición de nucleósidos en presencia de arcilla: análisis por HPLC: a) Adenosina, b) Citidina.

Fuente: datos experimentales.

En los incisos *a.* y *b.* de la *figura 18* se ejemplifica con los cromatogramas de dos nucleósidos (uno purínico y otro pirimidínico) el comportamiento de éstos compuestos al ser irradiados, con una dosis de 51.70 KGy, estando adsorbidos en arcilla. El resultado se compara gráficamente con el obtenido al irradiar el mismo compuesto en ausencia de arcilla.

Se observa que en presencia de arcilla, la adenosina sobrevive a la dosis aplicada y se forma una cantidad considerable de adenina; mientras que en ausencia de arcilla no se recupera adenosina, y sólo una pequeña cantidad de adenina.

En el caso de la citidina, tras la dosis aplicada no se recupera el nucleósido, pero sí una mayor cantidad de la base nitrogenada en presencia de arcilla.

La *tabla 6* muestra los porcentajes relativos de nucleósido presentes en las muestras expuestas, en presencia de arcilla, a radiación gamma durante 5 horas (dosis = 51.70 KGy); comparados con los que se obtienen de las desorciones efectuadas sin irradiar y de las disoluciones irradiadas el mismo tiempo en ausencia de arcilla. Los porcentajes fueron calculados sobre las áreas relativas de los picos en los cromatogramas obtenidos por HPLC, tal como se calcularon para el experimento de desorciones.

*Tabla 6.: Porcentaje de nucleósidos presentes en muestras irradiadas en presencia de arcilla.*

Muestra	% de Nucleósido Adsorbido	Experimento en presencia de arcilla		% de Nucleósido remanente tras irradiación en ausencia de arcilla
		% de Nucleósido recuperado sin irradiación	% de Nucleósido recuperado tras irradiación	
Adenosina	90.52	55.87	51.23	0
Guanosina	88.46	72.94	25.76	0
Citidina	68.14	72.04	0	0
Uridina	4.41	50.34	0	0
Xantosina	73.89	77.50	56.49	0

Fuente: datos calculados sobre experimentales.

En la tabla se señala que en ausencia de arcilla, no se recupera ningún nucleósido tras la dosis aplicada, mientras que en presencia de arcilla, aún cuando disminuye el porcentaje de recuperación frente al que se obtiene sin irradiar las muestras, es posible recuperar nucleósidos purínicos y xantosina. Los pirimidínicos se destruyen con esa dosis.

## E. Experimentos de Desecación:

### 1. Desecación de arcillas con nucleósidos adsorbidos a distintas temperaturas: *análisis por HPLC*

En los incisos *a*, *b*. y *c*. de la *figura 19* se ejemplifica el comportamiento de los tres tipos de nucleósidos del estudio (purínicos -adenosina-, pirimidínicos -citidina- y la xantósina), al ser desorbidos de arcilla que fue sometida a desecación a tres distintas temperaturas.

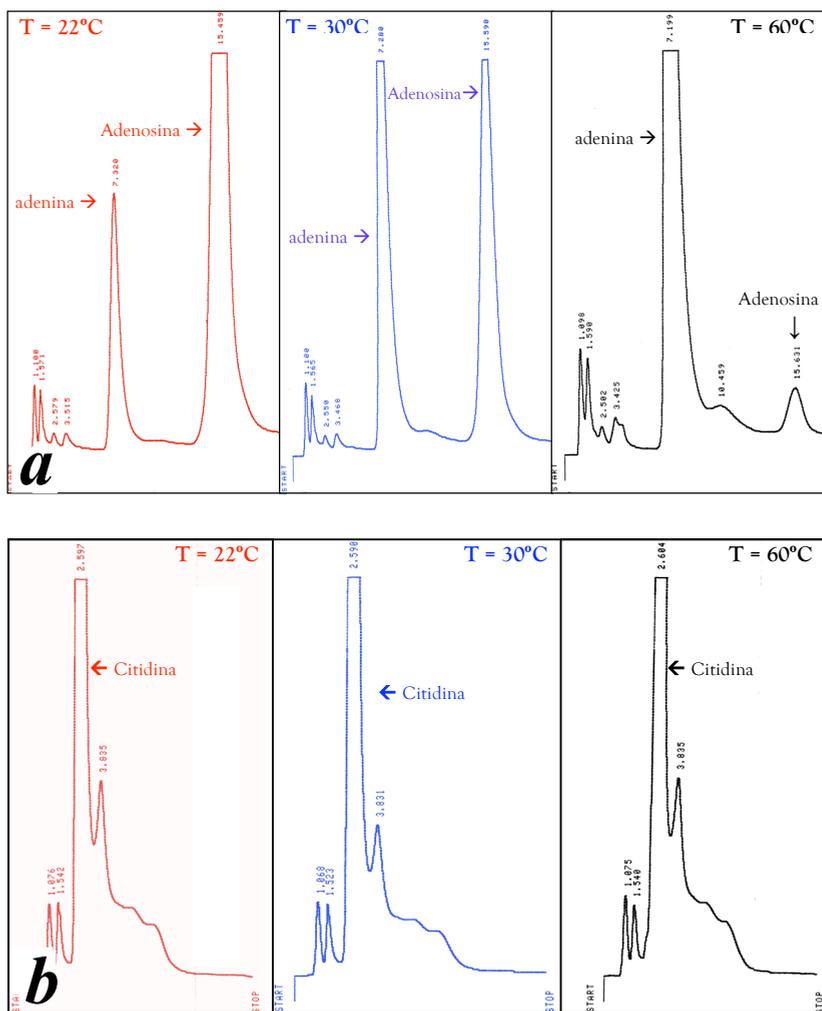


Fig. 19. Continúa...

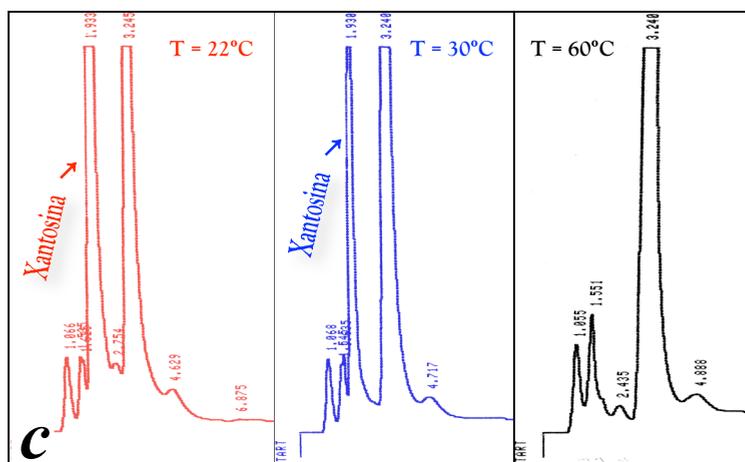


Fig. 19.: Desecación a distintas temperaturas de nucleósidos adsorbida en arcilla: análisis por HPLC: a) Adenosina, b) Citidina, c) Xantósina.

Fuente: datos experimentales.

La tabla 7 muestra la relación porcentual de nucleósidos y sus bases nitrogenadas en los cromatogramas obtenidos para el experimento de desecación a distintas temperaturas. Los valores son calculados a partir de las áreas de los picos en los cromatogramas.

Tabla 7.: Porcentaje de nucleósidos y sus bases nitrogenadas recuperados tras desecación de la arcilla a distintas temperaturas.

MUESTRA		Temperatura de Desecación		
		T = 22°C	T = 30°C	T = 60°C
Adenosina	% de nucleósido	79.83	48.12	3.89
	% de base nitrogenada	15.54	46.93	84.52
Guanosina	% de nucleósido	87.11	77.27	46.28
	% de base nitrogenada	9.05	17.37	41.88
Citidina	% de nucleósido	91.13	87.49	91.02
	% de base nitrogenada	0	0	0
Uridina	% de nucleósido	78.32	76.88	79.45
	% de base nitrogenada	0	0	0
Xantósina	% de nucleósido	63.21	25.94	0
	% de base nitrogenada	0	0	0

Fuente: datos calculados sobre experimentales.

Se observa que para los nucleósidos purínicos, a medida que se incrementa la temperatura, disminuye el porcentaje de nucleósido recuperable e incrementa el de su base nitrogenada correspondiente. En el caso de los nucleósidos pirimidínicos no hay cambios significativos relacionados con la temperatura. La xantósina sufre descomposición al incrementarse la temperatura, pero no produce xantina. Nuevamente, queda fuera del enfoque del estudio el determinar los productos de descomposición.

## V. Discusión de Resultados

Antes de iniciar los experimentos de adsorción y demás pruebas se verificó la estabilidad de los nucleósidos en disolución a un intervalo amplio de valores de pH (entre 2 y 10), para descartar que los resultados de las pruebas realizadas en presencia de arcilla fuesen efecto directo del pH de la disolución más que de la superficie mineral. Para ello se monitoreó por HPLC el comportamiento de las disoluciones durante 12 días (que se consideró tiempo apropiado para este experimento simulado). Se encontró que para todos los nucleósidos en estudio, la estabilidad conforme pasa el tiempo, a pH ácido y neutro es siempre superior al 80.8%, y es mayor que a pH básico, donde el límite inferior se situó en 65.1%. Durante el período monitoreado no se detectan, como productos de descomposición, cantidades mesurables de las bases nitrogenadas correspondientes a cada nucleósido.

Inclusive, se analizaron disoluciones de nucleósidos a pH 2 almacenadas en refrigeración (a 10°C) por períodos cercanos a un año y se observó sólo hidrólisis parcial de las muestras (se identificó la base nitrogenada correspondiente), que aún contenían más del 60% del analito original.

Estos resultados contradicen hasta cierto punto las referencias que señalan la facilidad con que se hidrolizan estos compuestos a pH ácido, en especial los purínicos (Peña, *et al.*, 2004). Probablemente suceda que se requieran períodos más largos, mayor temperatura y concentraciones de ácido más altas para promover la hidrólisis.

En las gráficas de estabilidad de algunos nucleósidos (guanosina y citidina en particular) se presentan algunos puntos a pH alcalinos en los que se detecta “más del 100%” esperado de analito. Estos pueden deberse a la formación de aductos del nucleósido con grupos OH del medio alcalino, que serían compuestos con coeficientes de extinción más altos que absorberían en la misma longitud de onda y que podrían presentar el mismo tiempo de retención que los nucleósidos (o muy cercano), por lo que aparecerían dentro del mismo pico sin separarse.

El que los picos oscilen se relacionaría con equilibrios entre las especies formadas y la original, así como variaciones en las mediciones experimentales.

En todo caso, para efectos del estudio, puede descartarse que los resultados de los experimentos siguientes fuesen consecuencia directa de la acidez del medio, en vez de ser efecto de la presencia de las arcillas, sobre todo considerando que los cinco nucleósidos resultaron

muy estables a pH=2, único pH al que se requirió exponer las muestras por períodos de más de unas horas.

## A. Pruebas de Adsorción

Al igual que las bases nitrogenadas y otros compuestos estudiados en trabajos precedentes, como los de Andrés Guzmán Marmolejo (2006), y María Colín García (1999), los nucleósidos pueden ser rápidamente adsorbidos por la montmorillonita de sodio a valores de pH bajos (cerca de 2), alcanzando un máximo de adsorción tras 10 min de agitación de la mezcla. Siendo los de origen purínico (adenosina y guanosina) los adsorbidos en mayor porcentaje.

La mayor facilidad de adsorción de los nucleósidos purínicos puede deberse a varios factores a la vez, pero estructuralmente, podría pensarse en que poseen más orbitales  $\pi$  que permiten la deslocalización de electrones en su estructura de manera más extensa que en los nucleósidos pirimidínicos, y éstos contribuyen a la adsorción. Sin embargo, los factores que afectan el fenómeno de adsorción de cada compuesto son específicos de cada molécula, pues abarcan desde sus valores de pKa, fuerzas de van der Waals, fuerza iónica de la solución y fenómenos de co-adsorción, hasta impedimentos estéricos causados por la forma y tamaño de las moléculas (Negrón, *et al.*, 2010).

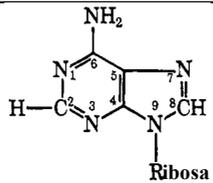
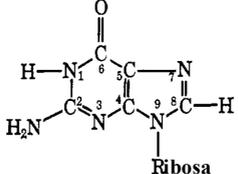
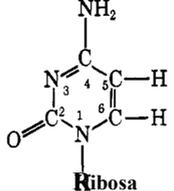
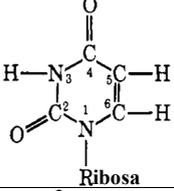
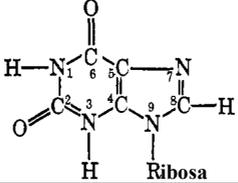
Las diferencias entre la capacidad de adsorción de estas moléculas a distintos pH se relacionan con las estructuras de sus especies dominantes en cada medio, debido a que el mecanismo de adsorción principal en arcillas es el intercambio iónico (Lailach, *et al.*, 1968).

Inicialmente, a pH=2 se esperaría que todas estuviesen completamente protonadas, de manera que puedan entrar en el canal interlaminar de la arcilla (cargado negativamente), sin embargo, no todas habrían de mostrar exactamente el mismo comportamiento a los mismos valores de pH, como se ha comprobado para algunas bases nitrogenadas (Guzmán-Marmolejo, 2006).

Por ejemplo, para la uridina, el porcentaje de adsorción es sumamente bajo (2.61%) a pH 2, y prácticamente cero para todos los nucleósidos a pH 6. Utilizando los valores de pKa de los nucleósidos (Véase Tabla 8.) para estimar los probables comportamientos de éstos a pH =2, se puede entender que la Uridina ( $pK_1 < 0.5$ ), seguida de la Xantosina ( $pK_1 = 2$ ), tengan tan bajos porcentajes de adsorción, pues no se hallan totalmente protonadas a ese pH. En contraste, la

Adenosina ( $pK_1 = 3.5$ ), Guanosina ( $pK_1 = 4$ ) y Citidina ( $pK_1 = 4.3$ ) que se debiesen hallar totalmente protonadas por sus  $pK_a$  más altos, presentan porcentajes de adsorción mayores.

**Tabla 8.:** Sitios de ionización y  $pK_a$  de nucleósidos.

Nucleósido	$pK_a$	Especie	Sitio de Ionización	Estructura base
Adenosina	$pK_1 = 3.5$	cación	$N_1$	
	$pK_2 = 12.34$	neutra	ribosa: 2', 3'-OH	
	$pK_3 = \sim$	anión	...	
Guanosina	$pK_1 \approx 4$	cación	$N_7$	
	$pK_2 = 9.25$	neutra	$N_1/C_6O$	
	$pK_3 = \sim$	anión	ribosa	
Citidina	$pK_1 = 4.3$	cación	$N_3$	
	$pK_2 = 12.24$	neutra	ribosa	
	$pK_3 = \sim$	anión	...	
Uridina	$pK_1 \leq 0.5$	cación	?	
	$pK_2 = 9.3$	neutra	$N_3/C_4O$	
	$pK_3 = 12.59$	anión	ribosa	
Xantosina	$pK_1 \approx 2$	cación	$N_7$	
	$pK_2 = 5.67$	neutra	$N_1/C_6O/C_2O$	
	$pK_3 = \sim$	anión	ribosa	

Fuente: datos seleccionados de Izatt, et al. (1977).

En la tabla 8. se muestran los valores promedio publicados para los  $pK_a$  de los nucleósidos. No se halla bien establecida la estructura de todas las especies, pues se desconocen con exactitud los sitios de protonación en algunos nucleósidos, mientras que en otros, como en la xantosina, se especula sobre “micro-especies” que se forman simultáneamente y mantienen un equilibrio en un cierto intervalo de pH (Izatt, et al. 1977).

Debe recordarse nuevamente que existen otros mecanismos de adsorción que modifican el comportamiento de cada compuesto orgánico, de acuerdo a su estructura, como la formación de complejos con los contraiones presentes en el canal interlaminar de las arcillas (van Olphen, 1977) y fuerzas de Van der Waals.

El experimento demuestra la capacidad concentradora que las arcillas poseen para los nucleósidos en general, aún cuando señala diferencias sustanciales entre los de origen purínico y pirimidínico. El hecho de que puedan ser concentrados dentro de la arcilla, resulta muy importante en el contexto de evolución química, puesto que se ha estimado que en la “sopa primigenia” propuesta por Oparin-Haldane, las moléculas de importancia biológica debieron hallarse en concentraciones sumamente bajas, entre  $10^9\text{M}$  y  $10^{11}\text{M}$ , lo que haría difícil que ocurrieran reacciones entre ellas (Shapiro, 1986). El que las moléculas se concentren dentro de la red del mineral permite plantear la posibilidad de que la proximidad entre las moléculas promoviera en algún momento y bajo condiciones particulares, la síntesis de compuestos más complejos o reacciones de polimerización.

Pese a que se supone los océanos en la Tierra primitiva tuvieron valores de pH cercanos a 8 (Mosqueira, *et al.*, 1996) y éstos han probado ser inadecuados para la adsorción de varios compuestos orgánicos (como los nucleósidos en este caso), se ha propuesto que cuerpos de agua menores pudieron, gracias a su dinámica de flujos y evaporación, sufrir amplias variaciones de pH, inclinándose a medios ácidos por la formación de ácido carbónico y fórmico por adsorción de dióxido de carbono atmosférico en el agua (Walker, 1985). El descenso en el pH en esos microambientes podría haber favorecido la adsorción y concentración de estos compuestos orgánicos.

Adicionalmente se hizo un experimento de difracción de rayos X de polvos para comprobar si la adsorción se realizaba efectivamente dentro del canal interlaminar (como se supondría debiese ser, por tratarse de especies cargadas positivamente en medio ácido). En él, se adsorbió cada nucleósido en la arcilla y ésta se sometió a desecación a baja temperatura para eliminar el agua totalmente.

En todos los casos se observó el ensanchamiento del canal interlaminar de manera coincidente con los porcentajes de adsorción calculados para cada nucleósido en el experimento anterior, de modo que, por ejemplo, el ensanchamiento del canal para la arcilla con adenosina adsorbida a  $\text{pH}=2$  (de  $11.91 \text{ \AA}$  en la arcilla pura a  $14.07 \text{ \AA}$ ) es considerablemente

mayor al observado en arcilla con adenosina adsorbida a pH=6 (de 11.91 Å a 12.93 Å), pH al que el porcentaje de adsorción registrado fue mínimo.

## B. Pruebas de Desorción

Para que un mineral se considere útil como superficie concentradora de un compuesto en particular, no sólo debe ser capaz de adsorberlo, sino debe liberarlo intacto, por lo menos en algún porcentaje. Por ello, se efectuaron las pruebas de desorción a cada nucleósido, a distintos valores de pH, observando su comportamiento en los distintos medios.

Se ensayó la desorción de los nucleósidos a pH 2, 5, 8 y 12, valores seleccionados pensando en los probables ambientes terrestres primitivos. A pH 2 no se consigue extraer nada, y a pH 12 se observa descomposición de los nucleósidos. A pH 5 y 8 sí ocurre desorción, siendo mayor el porcentaje recuperado a pH 8. Ésto se explica fácilmente si se piensa nuevamente en términos de las especies formadas al pH del experimento. A pH básico los nucleósidos dejan de estar protonados y son liberados de la estructura cristalina de la arcilla, siendo reemplazados por agua y cationes intercambiables del medio.

El que el porcentaje de recuperación no sea del 100%, y en particular, el que no se haya recuperado nada de xantosina ni uridina a pH=5 sugieren que el intercambio iónico no es el único mecanismo de adsorción, por lo que el cambio de pH no libera todas las moléculas que ingresaron. Podría suceder que el bajo porcentaje de xantosina y uridina que se adsorbieron en la arcilla no lo hicieran por intercambio iónico, dado que no se hallaban totalmente protonadas, sino formarían alguna otra clase de unión que no puede ser liberada fácilmente por el simple cambio del pH del medio.

Al ensayarse una “segunda extracción” de los nucleósidos de la arcilla, se comprobó que es posible sacar otra pequeña cantidad repitiendo el proceso, lo que podría señalar que las uniones formadas por las moléculas orgánicas no son siempre tan fuertes, y compiten con el agua, de modo que ésta puede ir las desplazando progresivamente. Ésta podría resultar una explicación factible si se considera que la adsorción como fenómeno complejo, depende entre otros factores, del número de moléculas de agua presentes (Colin-García, 1999).

Se investigó al mismo tiempo la posibilidad de que el tiempo que pasan los nucleósidos adsorbidos alterase su estructura, ya que es probable que en la Tierra primitiva, pasaran períodos prolongados antes que las condiciones circundantes (de pH especialmente) cambiaran lo suficiente como para ocasionar la desorción. Aunque los tiempos geológicos no son

comparables a los del experimento, éste puede brindar alguna clave sobre el efecto catalítico que podrían haber tenido las arcillas sobre estas moléculas orgánicas a corto y/o mediano plazo.

De este modo, se observó que no hay cambios significativos en el porcentaje recuperado de nucleósido tras la desorción, habiéndose efectuado ésta inmediatamente después de la adsorción y siete días más tarde.

### C. Experimentos de Irradiación

A diferencia de las bases nitrogenadas, los nucleósidos en disolución son considerablemente resistentes a la irradiación gamma anóxica en ausencia de arcilla, sobreviviendo intensidades de dosis promedio de 172.33 Gy/min hasta por 2 horas antes de descomponerse totalmente. Esto se debe probablemente a su estructura más grande y rica en electrones que les permite deslocalizar la energía recibida y los radicales libres que se forman, durante más tiempo.

Todos los nucleósidos examinados, exceptuando la uridina que se destruye casi inmediatamente, resisten sin mayor cambio dosis de radiación de hasta 20.68 KGy, tras la cual decaen rápidamente, pasando por la formación de sus bases nitrogenadas y la posterior destrucción de éstas, al alcanzar los 51.70 KGy. Sin embargo, dicha resistencia es más marcada en los nucleósidos purínicos. La probable explicación a este fenómeno se encuentra en la mayor capacidad de resonancia (deslocalización) de la energía y radicales recibidos durante la irradiación que presentarían los nucleósidos purínicos, gracias a su estructura con orbitales  $\pi$  más extendidos, la cual los haría más resistentes.

Cuando los nucleósidos purínicos y la xantosina son adsorbidos en arcilla y se les somete a irradiación, pueden ser recuperados en porcentajes variables (siempre menores a los obtenidos cuando se extraen de arcilla sin irradiar) aún después de someterlos a la dosis de radiación ensayada durante 5 horas (51.70 KGy), lo que demuestra la capacidad de las arcillas para protegerlos.

Los nucleósidos pirimidínicos adsorbidos en arcilla no sobrevivieron la dosis ensayada durante 5 horas como los purínicos. En el caso de la citidina se recuperó citosina, su base nitrogenada, lo que conduce a pensar que el nucleósido resiste la dosis aplicada durante algún tiempo, pero no las 5 horas. En el caso de la uridina, es probable que dada la mínima cantidad que se adsorbe, el porcentaje que se pierde en la desorción, y el porcentaje destruido por la radiación, no haya sido detectable lo que sobrevivió al proceso. Así mismo, como se estableció

en el experimento de irradiación en ausencia de arcilla, la uridina es más propensa a la descomposición inducida por radiación, así que era de esperarse en cierto modo, no fuese capaz de resistir esa dosis por tanto tiempo.

El efecto protector de la arcilla sobre los nucleósidos purínicos y la xantosina adsorbidos en ella puede explicarse como resultado de que ésta absorbe y dispersa a través de su estructura cristalina parte de la energía recibida de la fuente, al igual que lo hace el agua de la disolución. Con ello se disminuye la probabilidad de la ionización directa sobre los nucleósidos, lo que reduce la velocidad de degradación de las moléculas.

Al mismo tiempo, al estar fijadas las moléculas en su sitio de adsorción, no pueden interactuar libremente con todo el medio, estando limitadas a reaccionar con especies vecinas. De esta forma, disminuyen las interacciones con los productos de radiólisis del agua (o efectos indirectos de la radiación), que son probablemente responsables en buena medida de la descomposición de las moléculas orgánicas (Guzmán-Marmolejo, 2006). Así mismo, al haber menor cantidad de agua en el canal interlaminar, disminuyen los productos de radiólisis alrededor de las moléculas orgánicas adsorbidas, como el  $\cdot\text{OH}$ , los cuales constituyen las especies más reactivas hacia los grupos aromáticos.

El resultado final del experimento revela que las arcillas sí tienen un efecto protector de los nucleósidos (purínicos especialmente) frente a la radiación ionizante, lo que en términos de evolución química constituye un hecho importante, ante la posibilidad de que éstos se hubiesen formado en la Tierra primitiva (y de hecho, los purínicos son los únicos cuya síntesis abiótica se ha establecido apropiadamente bajo condiciones prebióticas (Collins, 2005)), pues podrían haberse concentrado y protegido en esta clase de minerales, para más adelante formar estructuras más complejas, como se ha postulado en la teoría del mundo de ARN (Collins, 2005).

#### **D. Experimentos de Desecación**

Además del pH, la temperatura fue un factor variable durante el período de evolución química en la Tierra, el cual pasó en el océano de 80°-100°C a 30°-50°C (Lowe, 1994). Con esas temperaturas era posible la evaporación constante del agua, especialmente en regiones de aguas someras, al borde de las placas pseudocontinentales, en las que arcillas pudieran haber estado en contacto constante con el agua y la desecación. Por ello, se hace valioso el investigar

el efecto que la desecación a distintas temperaturas podría haber tenido en compuestos orgánicos como los nucleósidos.

Según los experimentos, el tiempo que los nucleósidos pasan adsorbidos en la arcilla no afecta su estructura (análogamente a como ocurre con las bases nitrogenadas, que han sido evaluadas luego de permanecer adsorbidas por períodos de más de un año), a diferencia de la temperatura, cuyo incremento promueve la hidrólisis de los nucleósidos purínicos y descomposición de la xantosina. Los nucleósidos pirimidínicos no se ven afectados.

Estos resultados podrían interpretarse como producto de diferencias en el tipo de adsorción que sufre cada nucleósido. En el caso de los purínicos que se hidrolizan, la reacción es posiblemente efecto del calentamiento del medio ácido de la disolución al momento del desecado, puesto que calor y medio ácido son condiciones típicas de hidrólisis (Luque, 2001). A pesar de ello, estos nucleósidos sobreviven en pequeñas cantidades a temperaturas de 60°C, lo que les brindaría oportunidad de sobrevivir aún en esos casos. No así la xantosina, cuya descomposición no se detiene en su base nitrogenada.

En el caso de los pirimidínicos, podría pensarse que al no ser adsorbidos por intercambio iónico, forman alguna clase de complejo con los iones intercambiables del canal interlaminar o la misma estructura cristalina de la arcilla, el cual impide (ya sea por repulsiones electrostáticas o estéricas) la hidrólisis ácida del nucleósido aún cuando se incrementa la temperatura.

## VI. Conclusiones y Consideraciones Finales

Se puede afirmar que las arcillas como la montmorillonita de sodio, funcionan como superficies concentradoras de nucleósidos, especialmente del tipo purínico. El hecho resulta importante porque indica que de haber existido estas moléculas u otras análogas durante el período de evolución química de la Tierra primitiva, éstas podrían haber interactuado entre sí al hallarse próximas unas a las otras, favoreciendo reacciones que condujeron al aumento de complejidad de los sistemas prebióticos.

Dicha capacidad concentradora es especialmente dependiente de la estructura de cada nucleósido y el pH del medio acuoso en que se lleve a cabo, según sugieren las variaciones en los porcentajes de adsorción y desorción de los distintos tipos de nucleósidos, en relación con las especies químicas dominantes a en cada valor de pH. El mecanismo principal de adsorción para estas moléculas orgánicas es el intercambio iónico, aún cuando existen otros que proceden al mismo tiempo.

La adsorción de los nucleósidos es favorecida a pH ácido (alrededor de  $\text{pH}=2$ ), y su desorción a pH neutro o ligeramente básico (alrededor de  $\text{pH}=8$ ), puesto que el proceso ocurre dentro del canal interlamilar de la arcilla, que posee cargas negativas ocasionadas por la estructura tridimensional de este mineral.

Las condiciones de pH requeridas por los nucleósidos para su adsorción implicarían que ese proceso se llevó a cabo únicamente en microambientes de la Tierra primitiva, donde condiciones atmosféricas procuraron el incremento de la acidez en medios acuosos.

Además de actuar como superficie concentradora, la montmorillonita de sodio presenta un efecto protector sobre los nucleósidos orgánicos adsorbidos en ella, especialmente notorio para los del tipo purínico. La causa de tal fenómeno se relaciona probablemente con dos situaciones independientes: la capacidad de la arcilla de capturar parte de la energía que se aplica, disminuyendo los efectos ionizantes directos de la radiación, y la reducción del número de interacciones que pueda llevar a cabo cada molécula de nucleósido con los productos de radiólisis del agua (particularmente con el radical OH), al estar adsorbidas en un punto fijo dentro de la estructura cristalina del mineral.

Finalmente, la temperatura a la que se desecan las arcillas en las que se adsorbieron nucleósidos afectan especialmente a los del tipo purínico y a la xantosina, desencadenando su hidrólisis ácida al incrementarse.

## VII. Referencias Bibliográficas

- Akabori, S. (1955). Asymmetric synthesis of amino acids and formation of fore proteins. *Kagaku* 25, 54-59.
- Akabori, S., Ogawa, K., and Sato, M. (1956). Introduction of side chains into polyglycine dispersed on solid surface I: Bull. Chem. Soc. Japan, 29, 608-611.
- Albarrán, G. (1982). Algunas Técnicas de Laboratorio en Química de Radiaciones de Soluciones Acuosas. Informe Técnico. Departamento de Química CEN-UNAM. Pág. 3-4 13pp.
- Bernal, J. D. (1951). *The physical bases of life*. Routledge and Keegan Paul. Londres.
- Chang, S. (1994). The planetary setting of prebiotic evolution. En: *Early Life on Earth. Nobel Symposium No. 84*. (Bengston eds.) Columbia U.P. New York, Estados Unidos. Pp. 10-23.
- Chittenden, G. J. F y Schwartz, A. W. (1976). *Possible pathway for prebiotic uracil synthesis by photodehydrogenation*, Nature 263, p. 350.
- Chyba, C. y Sagan, C. (1992). Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life. *Nature*. 355: 125-132
- Colin, G. M. (1999). Efectos de la presencia de la Montmorillonita de Na en la radiólisis de ácido succínico y sus posibles implicaciones en la evolución química. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Collins, J. P. (2005). Prebiotic Synthesis of Pyrimidine Nucleosides. Georgia Institute of Technology, US. pp. 68
- Cooper, J. D., Miller, R. H. y Patterson, J. A. (1986). Trip Through Time: Principles of Historical Geology. Columbus: Merrill Publishing Company, pp. 180.
- Could, P. E. (1977). Atmospheric and Hidrosferic Evolution on the Primitive Earth. En: *The Archean Search for the Beginning*. (Mc all G.J.H. ed.) Dowden Hutchinson & Ross Inc. Estados Unidos. Pp. 29-36.
- Cruz-Castañeda, J. A. (2008). Reacciones en el ácido behénico inducidas con temperatura y radiación gamma adsorbido en una arcilla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Degens, E. T., Matheja, J. Jackson, T. A. (1970). *Template catalisis: Asymetric polymerization of amino-acids on clay minerals*. Nature 227: 492-93.
- Donnell, J. H. y Sangster, D. F. (1970). Principles of Radiation Chemistry. American Elsevier Publishing Company, Estados Unidos. 176 pp.
- Draganič, I. G. y Draganič, Z. D. (1978). Radioactivity and Radiation-Chemistry on the Early Earth. Lectura plenaria en el Segundo Simposium de Química Nuclear, Radioquímica y Química de Radiaciones, México.
- Domínguez, J. M. y Schifter, I. (1992). Las arcillas: el barro noble. Colección. La Ciencia desde México, Número 109. Fondo de Cultura Económica. México. 96 pp.
- Friebele, E., Shimoyama, A., Hare, P. E., Ponnampereuma, C. (1981). Adsorption of amino acids enantiomers by Na-montmorillonite. *Origins of Life*. 11,173-184.

- Graf, G. y Lagaly, G. (1980). Interaction of clay minerals with adenosine-5-phosphates. *Clay Clays Minerals*. 28,12-18.
- Greenberg, M.J. y Mendoza-Gómez, C.X. (1992). The seeding of life by comets. *Adv. Space Res.* 12 : (4)169-180
- Guzmán Marmolejo, A. (2006). Simulación de microambientes primitivos: Radiólisis de bases púricas y pirimidicas en presencia de una arcilla. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas. UNAM.
- Harvey, G. R., Degens, E. T., Mopper, K. (1971). *Synthesis of Nitrogen heterocycles on Kaolinite from CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub>*. *Naturwissenschaften* 12: 624-25.
- Harvey, G. R., Mopper, K., and Degens, E. T. (1972). Síntesis de carbohidratos and lipids on kaolinite. *Chemical Geology*, Volume 9, issues 1-4, pages 79-87.
- Hazen, R. M. (2005). Genesis: Rocks, minerals and the geochemical origin of life. *Elements. An internacional magazine of mineralogy, geochemistry and petrology.* 1: 135-137.
- Izatt, R. D., Christensen, J. J. y Rytting, J. H. (1977). Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides and nucleotides. *Chem. Rev.* 71 : 439-481.
- Kasting, J.F. (1993). Evolution of the Earth's Atmosphere and Hidrosphere. En: *Organic Geochemistry*. (Engel, M.H. y Macko, eds.) Plenum Press. Estados Unidos. Pp. 611-623.
- Lailach, G. E., Thompson, T. D. y Brindley, G. W. (1968). *Adsorption of pyrimidines, purines and nucleosides by Co, Ni, Cu and Fe (III)-montmorillonite*. *Clays and Clay Minerals*. 16: 295-301.
- Lazcano-Araujo, A. (1991). El Origen de la Vida. Evolución Química y Evolución Biológica. Trillas, México. 107pp.
- Levine, J. S., Augustsson, T. R. y Natarajan, M. (1982). The Prebiological Paleatmosphere: Stability and Composition. *Origins of Life*. 12:245-259.
- Lowe, D. (1994). Early environments: Constrains and opportunities for early evolution. En: *Early life on Earth. Nobel Symposium No. 84*. (Begston eds.) Columbi U.P. New York, Estados Unidos. Pp. 24-35.
- Luisi, P. L. (1998). About various definitions of life. *Origins of life and evolution of the biosphere*. 28: 613-622
- Luque, J. (2001). Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Elsevier, España. Pp. 28.
- Maher, K. A. y Stevenson, J. D. (1988). Impact frustration of the Origin of Life. *Nature*. 331: 612-614.
- Mason, S. F. (1992). *Chemical Evolution: Origins of the elements, molecules and living-systems*. Clarendon Press, Oxford, Estados Unidos. 317pp.
- Meléndez López, A. L. (2008) Sitio de adsorción de guanina en montmorillonita de sodio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
- Miller, S. L. (1953). A Production of Aminoacids Under Posible Primitive Earth Conditions. *Science*. 117: 528-529
- Miller S. y Orgel, L. (1974). *The origins of life on the Earth*. Prentice-Hall. New Jersey. 229pp.

- Miller, S. (1986) Current status of the prebiotic síntesis of small molecules. En: *Molecular evolution of life*. (Baltscheffsky, H., Jörnvall, H. y Rigler, R. eds.). Cambridge University Press. Cambridge. Pp: 5-11.
- Mosqueira, F. G., Albarrán, G. y Negrón-Mendoza, A. (1996). A review of conditions effecting the radiolysis due to  $^{40}\text{K}$  on nucleic acid bases and derivatives adsorbed on clay minerals; Implications in prebiotic chemistry. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. 26:75-94
- Navarro-González, R., McKay, C. P. y D. Nna Mvondo. (2001). A possible nitrogen crisis for Archean life due to reduce nitrogen fixation by lightning. *Nature*, 412:61-64.
- Negrón-Mendoza, A. y Navarro-González, R.. (1990). The irradiation of aqueous acetic acid-clay suspensions. *Origins of life and evolution of the biosphere*, 20:377-387.
- Negrón-Mendoza, A., Albarrán, G. y Ramos-Bernal, S. (1992). El papel de las arcillas en la etapa prebiótica de la Tierra. En: Maubert, A.M. y Bosch, P. Segundo Taller Iberoamericano sobre Tamices Moleculares, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para desarrollo. México. Pp.144-153.
- Negrón-Mendoza, A. y Albarrán, G. (1993). Chemical Effects of Ionizing Radiation and Sonic Energy in the context of Chemical Evolution. En *Chemical Evolution: Origin of Life*. (Ponnamperuma, C. y Chela-Flores, J. eds). A.DEEPAK Publishing. pp. 235-237
- Negrón-Mendoza, A., Albarrán, G., y Ramos-Bernal, S. (1996). Clay as natural catalyst in Prebiotic Processes. En: *Chemical Evolution: Physics of the Origin and Evolution of Life*. (Chela-Flores, J. y Raulin, F. Eds.) Kluwer, Academic Publishers, Holanda. Pp. 97-106.
- Negrón-Mendoza, A., Ramos-Bernal, S. y Mosqueira, F. G. (2010). The role of clay interactions in chemical evolution. En: *Astrobiology: emergence, search and detection of life*, (Basiuk, V. A. ed.). American Scientific Publishers, USA. Pp. 213-235.
- Oró, J. (1961). Mechanism of synthesis of adenina from hydrogen cyanide under possible primitive Earth conditions. En: *Origins of life. The Central Concepts*. (Deamer, D. y G. Fleischaker. eds.) Jones and Barlett Publishers. New York. pp. 157-158
- Oró, J., Milss, T. y Lazcano-Araujo, A. (1992). The cometary contribution to Prebiotic Chemistry. *Adv. Space Res.* 12: (4) 33-41
- Owen, T. (1985). Life as a Planetary Phenomenon. *Origins of Life*. 15: 221-234.
- Peña, A. (2004). Bioquímica. Limusa Noriega Editores. México, D.F.
- Perezgasga, L., Aguirre, M. E. y Negrón-Mendoza, A. (1988). Dosimetría de la Unidad Gammabeam 651 PT. Informe Técnico Q-01-88. CEN-UNAM, México. 12 pp.
- Ponnamperuma, C. y Molton, P. (1981). El Origen de la Vida. *Información Científica y Tecnológica*. 3: 7-33.
- Ponnamperuma, C., Shimoyama, A. y Friebele, E. (1982). Clay and the origin of life. *Origins of life*, 12: 9-40.
- Rao, M., Odom, D. G. y Oró, J. (1980). Clays in Prebiological Chemistry. *J. Mol. Evol.* 15: 317-331.
- Sagan, C. y Mullen, G. (1972). Earth and Mars: Evolution of Atmospheres and Surface Temperatures. *Science*. 177:52-56.

- Schidlowski, M., Appel, P. W. V., Eichmann, R. y Junge, C. E. (1979). Carbon isotope geochemistry of the  $3.7 \times 10^9$ -yr-old Isua sediments, west Greenland: implications for the Archean carbon and oxygen cycles. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **43**: 189-199.
- Serrato, A. (1996). Estudios de evolución química sobre la adsorción de adenina y poli A en una arcilla. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 59 pp.
- Shapiro, R. (1986). *Prebiotic ribose synthesis: a critical analysis*. *Origins of Life*, **18**: 71-85.
- Sillen, L. G. (1967). Master Variables and Activity Scales, in Gould, R.F. (ed.) *Equilibrium Concepts in Natural Water Systems*, Advances in Chemistry Series No. 67, Washington American Chemical Society, Pp. 45-56.
- Sleep, N. H., Zahne, K. J., Kasting, J. F. y Morowitz, H. J. (1989). Annihilation of ecosystems by large asteroid impacts on the early Earth. *Nature*. **342**:139-142
- Solomon, D. H. (1968). Clay minerals as electron acceptors and/or electron donors in organic reactions. *Clays and clay Minerals*. **16**: 31-39.
- Stanley, S. M. (1999). *Earth System History*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Treviño, C., Negrón-Mendoza, A., Pedraza, L. y Albarrán, G. (1987). Dosimetría de la Unidad Gammabeam 651 PT. Informe Técnico Q-03-87. CEN-UNAM, México. Pp 1-5.
- Urey, H. C. (1952). On the early chemical history of the Earth and de origin of life. En: *Origins of life. The Central Concepts*. (Deamer, D. y G. Fleischaker. eds.) Jones and Barlett Publishers, New York. pp 83-95.
- Van Olphen, H. (1977). An Introduction to clay Colloid Chemistry. For day Technologist, Geologist and Soil Scientist. John Wiley & Sons, Estados Unidos. Pp. 57-82.
- Vega-Arreguín J. C. (1998). Síntesis Prebiótica de Compuestos Orgánicos Reducidos a partir de la Irradiación  $\gamma$  de formiatos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 56pp.
- Walker, J. C. G. (1985). Carbon dioxide on the early Earth. *Origins of life*, **16**: 117-127.
- Walker, J. C. G. (1977). Origin of the Atmosphere: History of the release of volatiles from the solid Earth. En: *Chemical Evolution of the Early Precambrian*. (Ponnamperuma, ed.). Academic Press, Estados Unidos. Pp.1-11.
- Washington, J. (2000). The possible role of volcanic aquifers in prebiologic genesis of organic compounds and RNA. *Origins of life and evolution of the biosphere*. **30**: 53-79
- Yoshino, D., Hayatsu, R. y Anders, E. (1971). Origino f organic matter in early solar system - III. Aminoacids: Catalytic Synthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Volume 35, issue 9, pages 927-938.

## VIII. Anexos

### A. Obtención de Agua Tridestilada (Método de Donnell y Sangster, 1970)

Se conectan en secuencia tres equipos de destilación con columnas de Vigraux y condensadores. En el primer balón se coloca una solución de 1g  $\text{KMnO}_4$  + 1g  $\text{NaOH}$  / 1L de agua bidestilada, en el segundo 0.5mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 1g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  / 1L de agua bidestilada, en el tercero sólo se destila nuevamente el agua sin reactivo alguno.

Este procedimiento elimina toda la materia orgánica presente en el agua (Albarrán, G., 1982).

### B. Difracción de Rayos X: Método Analítico Aplicado

El procedimiento aplicado a las muestras en polvo fue: “Difracción de rayos X por el método de polvos para la Identificación de compuestos policristalinos”.

Las muestras se montaron en portamuestras de vidrio, utilizando el método: “montaje de polvo en una cavidad”, y se analizaron en un difractómetro SIEMENS D5000, utilizando radiación  $\text{K}\alpha$  de Cu ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ ), a 35 kV, 30 mA, durante 58 min, en un intervalo de  $3^\circ < 2\theta < 80^\circ$ . Se utilizó la base de datos “International Centre for Diffraction Data, Powder Diffraction File” (ICDD-PDF) para la identificación de la arcilla.