



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUÍS OTÁVIO DE BRITO BENETOLI

**ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS SOBRE
ARGILAS: IMPLICAÇÕES PARA A ORIGEM DA VIDA**

Londrina
2007

LUÍS OTÁVIO DE BRITO BENETOLI

**ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS SOBRE
ARGILAS: IMPLICAÇÕES PARA A ORIGEM DA VIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação, em Química dos Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Dimas A. M. Zaia
Co-Orientador: Prof. Dr. Henrique de Santana

Londrina
2007

LUÍS OTÁVIO DE BRITO BENETOLI

**ESTUDO DA ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS SOBRE
ARGILAS: IMPLICAÇÕES PARA A ORIGEM DA VIDA**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia – UEL
(Orientador)

Profa. Dra. Andréa Paesano Jr. – UEM

Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza - UEM

Londrina, 23 de fevereiro de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo ânimo e força necessários em cada etapa deste trabalho. Sem vocês este trabalho não seria possível.

“A evolução é bem mais esperta do que nós!”.

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grato ao Prof. Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia, amigo, “conselheiro” e exemplo de caráter e dedicação à pesquisa, que não só tolerou-me durante a iniciação científica como também no mestrado, sempre “levando luz onde há trevas!” Valeu mesmo Prof.!!!

Ao amigo e Prof. Dr. Henrique de Santana, que em momento algum mediu esforços na realização deste trabalho. Pela importante contribuição na minha formação como pesquisador.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Cássia Thaís B. V. Zaia pelo apoio, sugestões e espaço cedido durante a realização de alguns experimentos.

À família Zaia (Dimas, Thaís, Laura, Sofia e Lolly) pelos incontáveis almoços e clima familiar proporcionado.

A todos os professores do Dep. de Química-UEL, pelos seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Antonio C. S. da Costa, do Dep. de Agronomia da UEM, pelas análises de difratometria de raios-X.

Ao Prof. Dr. Andrea Paesano Jr, do Dep. de Física da UEM, pelas análises de espectroscopia Mössbauer.

A CAPES, pela concessão de uma bolsa de mestrado.

A todo pessoal do “laboratório 339”, em especial a Ivanira, Sabrina, Isadora, Diogo, Eduardo, Lizia e Cláudio, por todo apoio na realização dos experimentos.

Aos grandes amigos Alfredo, “Brrruno”, José Rafael “Mig’s”, Marquinhos “Pai”, Ramon, “Rato”, Tiago, Takano, Ulisses e àqueles que esqueci, por toda alegria, descontração e “discussões filosóficas” nos churrascos e barzinhos da vida.

À “república Gerby’s”, local de profunda inspiração científica.

Sou muito grato a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho. Esta dissertação é de todos nós!

BENETOLI, Luís Otávio de Brito. **Estudo da adsorção de moléculas sobre argilas**: implicações para a origem da vida. Londrina, 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Na primeira etapa do presente trabalho, a adsorção de aminoácidos (alanina, Ala; metionina, Met; glutamina, Gln; cisteína, Cys; ácido aspártico, Asp; lisina, Lys; histidina, His) sobre argilas (bentonita e caulim) foi estudada em diferentes faixas de pH (3,00, 6,00 e 8,00). Os aminoácidos foram dissolvidos em água do mar, contendo em sua composição os elementos de maior concentração presentes naturalmente. O principal resultado deste trabalho foi que a Cys pode ter tido um importante papel na química prebiótica além de ser apenas um aminoácido em peptídeos/proteínas. Os aminoácidos com grupo R carregado (Asp, Lys e His) e Cys (grupo polar R não-carregado) foram mais adsorvidos sobre argilas do que Ala, Met e Gln (grupo R não-carregado). Entretanto, 74 % dos aminoácidos nas proteínas dos organismos modernos contém grupo R não-carregado. Estes resultados geram algumas dúvidas quanto ao papel dos minerais em fornecer um mecanismo de concentração de aminoácidos. Diversos mecanismos que poderiam produzir peptídeos com uma maior proporção de aminoácidos com grupo R não-carregado são também discutidos. Os espectros de infravermelho FT-IR mostraram que a adsorção de aminoácidos em argilas ocorreu através do grupo amino, provavelmente como NH_3^+ . Entretanto, a interação Cys/argilas ocorreu através dos grupos sulfidril e também do grupo amino. A difratometria de raios-X mostrou que o pH afeta as camadas internas da bentonita e a expansão em pH 3,00 da Cys/bentonita foi maior que a expansão das amostras de etileno glicol/bentonita saturadas com Mg. O espectro Mössbauer para as amostras com Cys adsorvida mostrou um grande aumento (~20%) de íons ferrosos. Isto significa que a Cys foi capaz de reduzir parcialmente o ferro presente na bentonita. Este resultado é similar àquele que ocorre com a aconitase onde os íons ferrosos são reduzidos a Fe 2,5. Na segunda parte deste trabalho foi realizado um estudo de adsorção de diversas bases nitrogenadas (adenina, **A**; citosina, **C**; timina, **T**; uracila, **U**) dissolvidas em água do mar sobre argilas (caulim, bentonita e montmorilonita) em dois pHs (2,00 e 7,20). O caulim adsorveu muito pouco da **A** em pH 2,00 e nenhuma das outras bases aqui estudadas foram adsorvidas por este mineral. Os resultados mostram que as bases **A** e **C** adsorvem mais sobre as argilas bentonita e montmorilonita do que as bases **U** e **T**. Estes resultados sugerem duas questões: a) o pH onde ocorreu a maior adsorção é muito baixo, apesar de ocorrer em alguns hidrotermais, porém, seriam estes ambientes muito comuns? e b) o outro problema é ainda pior, a ocorrência das bases nos seres vivos não tem a mesma relação encontrada neste experimento. Uma análise das bases encontradas no DNA de diversos seres vivos mostra uma relação **A/T** por volta de 1,00. Entretanto os resultados obtidos mostram que em qualquer situação a **A** é muito mais adsorvida que a **T** ou seja a relação **A/T** é muito maior do que um. Estes resultados levantam algumas questões sobre o papel dos minerais em fornecer um mecanismo para concentração de bases: Poderíamos esperar que a composição das bases nitrogenadas adsorvidas sobre minerais refletisse as das DNA atuais? A adsorção de bases nitrogenadas sobre minerais foi importante para a origem da vida? Os dados de infravermelho mostram que todas as bases interagem com as argilas através do grupo amina.

Palavras-chave: Adsorção química. Química de superfície. Aminoácidos. Minerais de argila.

BENETOLI, Luís Otávio de Brito. **Study of the adsorção of molecules on argilas**: implications for the origin of the life. Londrina, 2007. 82f. Dissertation (Master in Chemistry of the Natural Resources) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

In the first part of this paper, the adsorption of amino acids (alanine, Ala; metionine, Met; glutamine, Gln; cysteine, Cys; aspartic acid, Asp; lysine, Lys; histidine, His) on clays (bentonite, kaolinite) was studied at different pH (3.00, 6.00, 8.00). The amino acids were dissolved in seawater, which contains the major elements. The main achievement of this paper was that Cys could play an important role in prebiotic chemistry besides just being one of the amino acids in the peptides/proteins. The amino acids with a charged R group (Asp, Lys, His) and Cys (uncharged R group) were adsorbed on clays more than Ala, Met and Gln (uncharged R groups). However, 74% of the amino acids in the proteins of modern organisms have uncharged R groups. These results raise some questions about the role of minerals in providing a concentration mechanism for amino acids. Several mechanisms are also discussed that could produce peptides with a greater proportion of amino acids with uncharged R groups. The infrared spectra (FT-IR) showed that the adsorption of amino acids on the clays occurs through the amine group, probably as NH_3^+ . However, the Cys/clay interaction occurs through the sulfhydryl and amine groups. X-ray diffractometry showed that pH affects the bentonite interlayer, and at pH 3.00 the expansion of Cys/bentonite was greater than that of the samples of ethylene glycol/bentonite saturated with Mg. The Mössbauer spectrum for the sample with absorbed Cys showed a large increase ($\sim 20\%$) in ferrous ions. This means that Cys was able to partially reduce iron present in bentonite. This result is similar to that which occurs with aconitase where the ferric ions are reduced to Fe 2.5. In the second part of this paper the adsorption of several DNA/RNA bases (adenine, **A**; cytosine, **C**; thimine, **T**; uracil, **U**) dissolved in seawater on clays (bentonite, kaolinite, montmorillonite) was studied at two pHs (2.00, 7.20). Kaolinite adsorbed a small amount of **A** at pH 2.00 and the other bases were not adsorbed on this mineral. The results showed that the bases **A** and **C** were much more adsorbed on bentonite and montmorillonite than the bases **U** and **T**. These results raise two questions a) the pH where the adsorption was bigger is very lower, beside it occurs in hydrothermal, but were these environments commons? b) the other problem is worst, the amount of base in the living beings do not have the same rate that were found in these experiments. The analyses of DNA bases of several organisms showed that rate of **A/T** are about 1.00. However the results showed that **A** is always more adsorbed than **T**, so the rate **A/T** is much bigger than one. These results raised some questions about the role of minerals in providing a concentration mechanism for DNA/RNA bases: should we expect the composition of adsorbed DNA/RNA bases on minerals to reflect that of present day DNA/RNA? Was the adsorption of nucleic acid bases on minerals important in the origin of life? The results of infrared spectroscopy showed that the bases interact to clays through amine group.

Keywords: Adsorption. Surface chemistry. Amino acids. Clay minerals.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Valores de pK_1 (α -COOH), pK_2 (α -NH ₃), pK_R (outro grupo presente na molécula) e pI para alguns aminoácidos.....	17
Tabela 2	– Valores de pK_a para cada estágio de ionização das bases nitrogenadas estudadas.....	19
Tabela 3	– Valores de p_{cz} e ASE dos argilo-minerais considerados neste estudo.....	22
Tabela 4	– Quantidade em μg de aminoácidos adsorvidos em 500 mg de caulim em três faixas de pH.....	37
Tabela 5	– Quantidade em μg de aminoácidos adsorvidos em 500 mg de bentonita em três faixas de pH.....	38
Tabela 6	– Parâmetros hiperfinos e áreas subespectrais Mössbauer para as amostras de bentonita com e sem cisteína adsorvida.....	60
Tabela 7	– Parâmetros de Langmuir das bases do DNA/RNA adsorvidas sobre argilas.....	62
Tabela 8	– Parâmetros de Freundlich das bases do DNA/RNA adsorvidas sobre argilas.....	63
Tabela 9	– Quantidade de bases de DNA/RNA adsorvidas sobre argilas.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química dos aminoácidos estudados.....	16
Figura 2 –	Estrutura das bases nitrogenadas estudadas.....	18
Figura 3 –	Esquema de síntese abiótica de purinas e pirimidinas.....	19
Figura 4 –	(A) - Estrutura da caulinita. (B) – Estrutura das esmectitas.	21
Figura 5 –	Concentração relativa de todos os aminoácidos.	42
Figura 6 –	Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), alanina sólida (b) e alanina adsorvida em bentonita (c); (B) caulim (a), alanina sólida (b) e alanina adsorvida em caulim (c).....	45
Figura 7 –	Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), ácido aspártico sólido (b) e ácido aspártico adsorvido em bentonita (c); (B) caulim (a), ácido aspártico sólido (b) e ácido aspártico adsorvido em caulim (c).....	46
Figura 8 –	Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), lisina sólida (b) e lisina adsorvida em bentonita (c); (B) caulim (a), lisina sólida (b) e lisina adsorvida em caulim (c).....	47
Figura 9 –	Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), histidina sólida (b) e histidina adsorvida em bentonita (c); (B) caulim (a), histidina sólida (b) e histidina adsorvida em caulim (c).....	49
Figura 10 –	Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), metionina sólida (b) e metionina adsorvida em bentonita (c); (B) caulim (a), metionina sólida (b) e metionina adsorvida em caulim (c).....	51
Figura 11 –	Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), glutamina sólida (b) e glutamina adsorvida em bentonita (c); (B) caulim (a), glutamina sólida (b) e glutamina adsorvida em caulim (c).....	52
Figura 12 –	Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), cisteína sólida (b) e cisteína adsorvida em bentonita (c); (B) caulim (a), cisteína sólida (b) e cisteína adsorvida em caulim (c).....	54
Figura 13 –	Difratogramas de raios-X das amostras orientadas de bentonita em equilíbrio com soluções contendo NaOH 0,1M em três valores de pH sem e com cisteína.....	57
Figura 14 –	Difratogramas de raios-X das amostras de bentonitas na presença ou ausência de cisteína em três valores de pH.....	58

Figura 15 – Espectro Mössbauer RT para a bentonita.....	59
Figura 16 – Espectro Mössbauer RT para a Cys adsorvida em bentonita. A figura interna mostra o espectro de Cys/Fe ³⁺	60
Figura 17 – Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), adenina sólida (b), citosina sólida (c), timina sólida (d), uracila sólida (e); (B) adenina (a), citosina (b) timina (d) e uracila (e) adsorvidas em bentonita.....	69
Figura 18 – Espectro FT-IR de: (A) montmorilonita (a), adenina sólida (b), citosina sólida (c), timina sólida (d), uracila sólida (e); (B) adenina (a), citosina (b) timina (d) e uracila (e) adsorvidas em montmorilonita.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1.2 AMINOÁCIDOS.....	15
1.3 BASES NITROGENADAS	17
1.4 ARGILO-MINERAIS: CANDIDATOS A EVOLUÇÃO QUÍMICA.....	20
1.5 ISOTÉRMAS DE ADSORÇÃO... ..	22
1.6 ADSORÇÃO DE BIOMOLÉCULAS SOBRE SUPERFÍCIES MINERAIS.....	23
1.6.1 ADSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE ARGILAS.....	23
1.6.2 ADSORÇÃO DE BASES NITROGENADAS SOBRE ARGILAS.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 MATERIAIS.....	28
3.1.1 Argilas.....	28
3.1.2 Reagentes.....	28
3.1.3 Aminoácidos.....	28
3.1.4 Bases nitrogenadas.....	29
3.1.5 Preparo de amostras.....	29
3.1.5.1 Aminoácidos.....	29
3.1.5.2 Bases nitrogenadas.....	30
3.1.6 Soluções.....	31
3.1.7 Equipamentos.....	33
3.2 MÉTODOS.....	33
3.2.1 Espectroscopia UV-Vis.....	33
3.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR).....	34
3.2.3 Difractometria de raios-X.....	34

3.2.4 Espectroscopia Mössbauer.....	35
3.2.5 Análise estatística.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.1 ADSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE ARGILAS.....	36
4.1.1 Adsorção.....	36
4.1.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR).....	44
4.1.3 Difratomia de raios-x.....	55
4.1.4 Espectroscopia Mössbauer (MS).....	58
4.2 Adsorção de bases nitrogenadas sobre argilas.....	61
4.2.1 Adsorção.....	61
4.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR).....	68
5 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Por todo o século 20 cunhou-se a idéia de que a vida surgiu de uma sopa primordial à qual, continha moléculas orgânicas que dadas às condições especiais, passariam por um processo de evolução química, culminando com a origem da vida em nosso planeta. Esta idéia foi proposta independentemente por Oparin e Haldane, tendo como base uma atmosfera altamente redutora. Dentre os compostos desta sopa primordial, diversas moléculas de interesse para o surgimento da vida foram sintetizadas abioticamente (incluindo aminoácidos – monômeros de proteínas; peptídeos; formaldeído e cianetos – que podem ter sido intermediários na formação de aminoácidos e de componentes de ácidos nucleicos; vitaminas; estruturas coacervadas, lipídios, etc), simulando diferentes condições presentes na Terra primitiva (Miller, 1953; Ferris *et al.*, 1978; Ferris e Hagan, 1984; Oró, 1960).

Outra hipótese para o surgimento da vida em nosso planeta foi proposta por Wächtershäuser (1988), que lança a idéia de que a vida emergiu baseada em um metabolismo autotrófico na superfície ferro/enxofre da pirita.

Experimentalmente, estudos conduzidos na área de origem da vida devem, a priori, reproduzir os ambientes existentes na Terra primitiva, ou seja, de aproximadamente 3.5 - 3.9 bilhões de anos atrás, data a qual a maioria das evidências aponta para o aparecimento das primeiras formas de vida (Mojzsis *et al.*, 1996).

Para ocorrer à evolução química em um ambiente na Terra primitiva o mesmo deveria ter as seguintes condições: (1) fonte de energia – a energia necessária para a formação de moléculas orgânicas complexas a partir de moléculas simples na Terra primitiva estava presente em diversas formas tais como: descargas elétricas, raios cósmicos, raios UV, impactos de meteoros e cometas, radioatividade, vulcanismo etc; (2) proteção – após as moléculas terem se formado, elas tinham que ser protegidas ou seriam destruídas pelo contínuo fluxo de energia, principalmente na forma de radiação ultravioleta do

Sol. Essa proteção poderia ser em águas mais profundas ou em fendas nas rochas, em sedimentos, ou mesmo adsorvidas sobre minerais; (3) pré-concentração de compostos – a diluição das biomoléculas no mar da Terra primitiva tornaria a evolução molecular impossível, de modo que devem ter existido mecanismos que favoreceram a pré-concentração de compostos, sendo estes: evaporação ou congelamento de pequenas lagoas, adsorção sobre minerais, entrada dentro de estruturas coacervadas, etc; e (4) catálise – muitas reações químicas são favorecidas por catalisadores, substâncias que auxiliam nas reações, mas não tomam parte nela sendo que as seguintes substâncias podem ser alguns exemplos de catalisadores primitivos: argilas, metais de transição, pequenas moléculas orgânicas, etc. No início, alguns catalisadores podem ter favorecido a origem de moléculas mais complexas e, posteriormente, determinadas reações podem ter sido favorecidas por catalisadores presos no interior de membranas (Menck e Oliveira, 2001).

Bernal (1951) foi o primeiro a sugerir que superfícies minerais poderiam ter sido de extrema relevância para o surgimento da vida na Terra. Desde então, diversos estudos têm sido publicados sobre a interação entre biomoléculas e superfícies minerais. Entre estes estudos, inclui-se, por exemplo, a adsorção de aminoácidos sobre argilas (Lahav e Chang, 1976; Henrichs e Sugai, 1993; Ben-Taleb *et al.*, 1994; Zaia *et al.*, 2002), e a adsorção de bases de ácidos nucleicos sobre argilas (Prabahar e Ferris, 1997; Sowerby *et al.*, 2001a; Sowerby *et al.*, 2001b). Todos estes estudos têm sugerido o possível envolvimento de superfícies minerais na evolução química da vida sobre a Terra primitiva.

1.2 AMINOÁCIDOS

Aminoácidos são os blocos construtivos (monômeros) das proteínas. Nesse sentido pode-se entender sua importância para os seres vivos modernos, uma vez que as proteínas constituem peças-chave na construção e manutenção da vida como a conhecemos. O apropriado funcionamento de qualquer célula viva depende do correto funcionamento de milhões de reações

que são catalisadas por biocatalisadores – a grande maioria destes catalisadores são proteínas chamadas de enzimas. Tendo em mente o princípio da continuidade biológica, assume-se que os aminoácidos tenham servido como blocos de construção de alguns dos biocatalisadores primitivos, similares em sua estrutura e funcionamento as proteínas contemporâneas (Lahav, 1994).

Aminoácidos foram sintetizados em condição de reação que existiram na Terra primitiva (Miller, 1953; Miller, 1987; Hennes *et al.* 1992) e têm sido detectados em materiais extraterrestres que são trazidos a Terra (Cronin, 1998). De acordo com as estimativas de Dose (1975), a concentração de aminoácidos no oceano primordial, levando-se em conta processos de produção e destruição no qual estavam sujeitos, foi de aproximadamente 10^{-7} mol L⁻¹.

Todos os aminoácidos, com exceção da prolina têm como denominador comum um grupamento carboxílico livre e um amino grupo livre não-substituído no átomo de carbono α . Eles diferem uns dos outros na estrutura de suas cadeias laterais distintas, denominadas grupamentos R. Uma das maneiras de classificar os aminoácidos está baseada na polaridade do grupamento R presente na estrutura. Existem quatro classes principais de aminoácidos: aqueles (1) com grupos R não-polares ou hidrofóbicos, (2) com grupos R neutros (sem carga) polares, (3) com grupos R carregados positivamente, e (4) com grupos R carregados negativamente (em pH 6,0 a 7,0) (Lehninger, 1976). A figura 1 apresenta alguns aminoácidos encontrados em proteínas e suas estruturas.

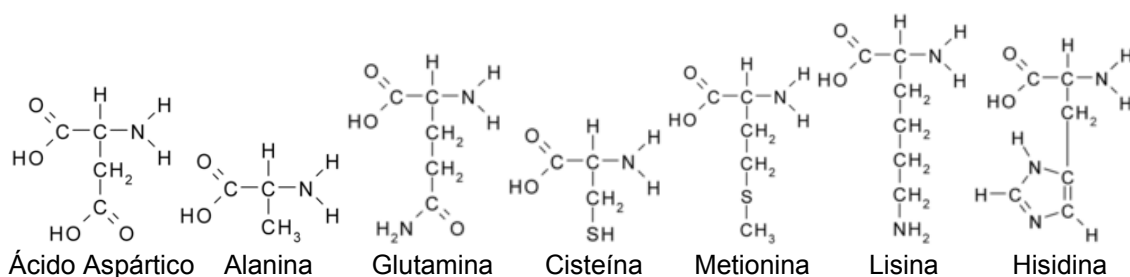


Figura 1 – Estrutura química dos aminoácidos considerados no estudo.

Propriedade bastante importante dos aminoácidos é o seu comportamento ácido-básico em solução aquosa, ocorrendo como íons dipolares, ou zwitterions, apresentando cargas tanto positivas quanto negativas na mesma molécula. Quando um aminoácido cristalino na forma de íons dipolares é dissolvido em água, ele pode agir como um ácido ou uma base (Lehninger, 1976). Os valores de pK_a (logaritmo negativo da constante de dissociação para os grupamentos $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ e $-\text{R}$) para cada etapa de ionização e os valores de pI (ponto isoelétrico - pH no qual não há carga elétrica efetiva na molécula do aminoácido) são dados na tabela 1 (Lide, 1998). Em pHs acima do valor de pI , os aminoácidos tornam-se aniônicos, enquanto que, abaixo do pI tornam-se catiônicos.

Tabela 1 – Valores de pK_1 ($\alpha\text{-COOH}$), pK_2 ($\alpha\text{-NH}_3$), pK_R (outro grupo presente na molécula) e pI para alguns aminoácidos.

Aminoácido	pK_1	pK_2	pK_R	pI
Alanina	2.34	9.69		6.00
Ácido aspartico	1.88	9.60	3.65	2.77
Cisteína	1.96	10.28	8.18	5.07
Glutamina	2.17	9.13		5.65
Histidina	1.82	9.17	6.00	7.59
Lisina	2.18	8.95	10.53	9.74
Metionina	2.28	9.21		5.74

1.3 BASES NITROGENADAS

O material genético encontrado em todos os seres vivos reside em duas macromoléculas: DNA e RNA. Estes ácidos nucléicos são os carregadores de informação nas células. Sua informação é estrutural, isto é, na forma de uma seqüência de diferentes monômeros ao longo do biopolímero

linear (Lahav, 1994). Estes se constituem em fontes de informação química que pode ser transmitida e reproduzida, se perpetuando no tempo e levando consigo a informação do que é e como funciona a vida e o que esta selecionou durante toda a sua evolução. Mesmo que DNA e RNA não tenham, muito provavelmente, se formado quimicamente logo nas etapas iniciais da vida sendo o produto de reações catalisadas (Cairn-Smith, 1982; Shapiro, 2000), o primeiro sistema genético deve ter tido alguma semelhança ao RNA (Cairn-Smith, 1982), isto é, a complexidade do sistema genético moderno deve ter sido precedido por um sistema bastante simplificado (com moléculas simples e um número limitado de reações) que passou por um longo processo de evolução até o estágio atual (Lahav, 1994). Portanto, é lógico olhar para aquelas que conferem individualidade química às unidades monoméricas tanto do DNA quanto do RNA, isto é, as bases nitrogenadas.

As bases do RNA incluem duas purinas (adenina e guanina) e duas pirimidinas (citosina e uracila), as quais são as mesmas do DNA exceto pela troca da uracila pela timina. A figura 2 traz a estrutura das bases purínicas e pirimidínicas predominantes em pH 7,0.

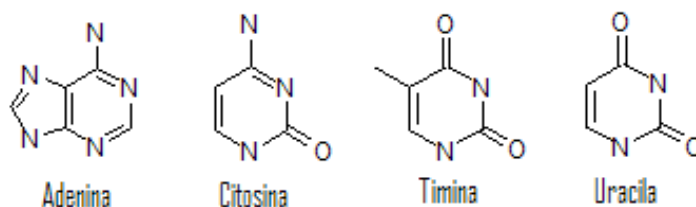


Figura 2 – Estrutura das bases nitrogenadas estudadas

A síntese abiótica de purinas e, em menor quantidade, de pirimidinas é possível a partir da condensação de HCN (Menck e Oliveira, 2001), as mesmas reações que produzem aminoácidos (Levy *et al.*, 2000). A figura 3 (Menck e Oliveira, 2001) ilustra a síntese de purinas e pirimidinas.

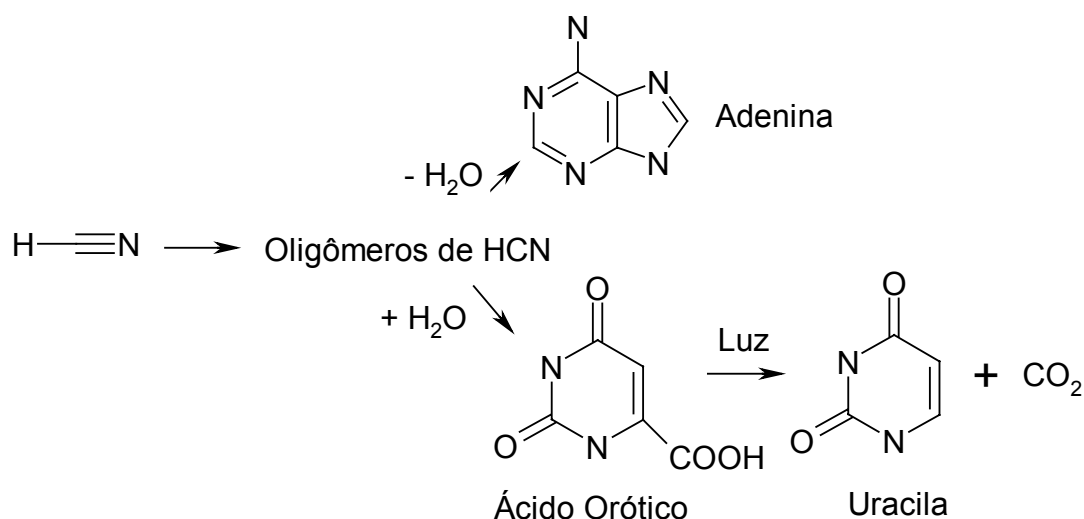


Figura 3 – Esquema de síntese abiótica de purinas e pirimidinas.

As bases nitrogenadas são compostos fracamente básicos que, dependendo do pH, podem ocorrer em duas ou mais formas tautoméricas (Lehninger, 1976). Os valores de pH do meio afetam o estado de ionização das bases, sendo cada estágio de ionização dado por seu valor de pK_a (logaritmo negativo da sua constante de dissociação). A tabela 2 (Lide, 1998) mostra os valores de pK_a para as bases consideradas.

Tabela 2 – Valores de pK_a para cada estágio de ionização das bases nitrogenadas estudadas.

Base	Valores de pK_a		
Adenina	<1	4,1	9,8
Citosina	4,5	12,2	
Timina	9,9	>13	
Uracila	0,5	9,5	>13

1.4 ARGILO-MINERAIS: CANDIDATOS A EVOLUÇÃO QUÍMICA

Argilo-minerais foram formados abundantemente em eras geológicas primitivas (Reynolds, 1988). Os tipos de minerais presentes sobre a Terra primitiva não são conhecidos exatamente. Vários ambientes prebióticos têm sido propostos, cada um com seus minerais associados. Entre os minerais que estariam associados à origem da vida, encontram-se entre os mais populares os argilo-silicatos, principalmente a montmorilonita, bentonita (esmectitas) e a caulinita (Lahav, 1994).

A adsorção de ânions e cátions sobre a superfície carregada (positivamente ou negativamente) dos argilo-minerais é considerada por muitos como o primeiro estágio de uma variedade de reações prebióticas (Lahav, 1994).

A carga elétrica tanto dos íons orgânicos quanto das superfícies minerais é dependente do pH do meio. Existe um determinado valor de pH em que a quantidade de cargas elétricas positivas e negativas são iguais, esse valor de pH, que é característico de cada argila, é denominado de ponto de carga zero (p_{cz}). Os principais grupos funcionais de superfície nos argilo-minerais (bordas) que geram cargas dependentes de pH são os grupamentos silanol (Si-OH) e Aluminol (Al-OH) (Meurer, 2000).

A caulinita é um mineral secundário (resultante da intemperização de um mineral primário), constituída por lâminas tetraedrais de Si^{4+} ligadas a lâminas octaedrais de Al^{3+} , através do compartilhamento de oxigênios apicais dos tetraedros (figura 4A) sendo, portanto, um mineral do tipo 1:1. Devido a forte interação entre as camadas, a caulinita não é expansível. Sua fórmula química típica é $Al_4Si_4O_{10}(OH)_8$ (Meurer, 2000).

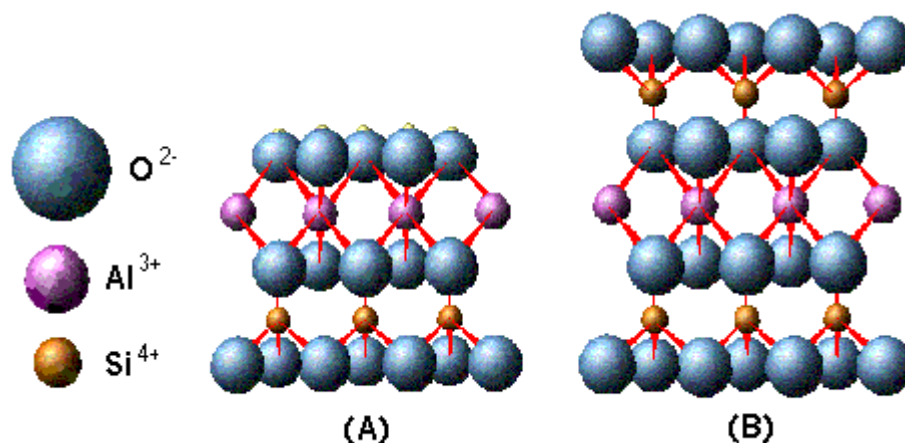


Figura 4 – (A) - Estrutura da caulinita (1:1). (B) – Estrutura das esmectitas (2:1).

A montmorilonita e a bentonita (esmectitas) são também minerais secundários, mas, do tipo 2:1 (figura 4B). As substituições isomórficas do Al^{3+} por Fe^{2+} e Mg^{2+} na lâmina octaédrica dão origem às cargas negativas, que vão se manifestar na superfície do mineral, sendo, por isso, mais fracas. Assim as esmectitas são expansíveis. A grande expansibilidade das camadas permite a entrada de cátions e moléculas. A montmorilonita é o mineral mais expressivo do grupo, e sua fórmula típica é $\text{M}_x\text{Al}_{3,2}\text{Fe}_{0,2}\text{Mg}_{0,2}\text{O}_{20}(\text{OH})_4$, onde x , é a carga líquida da camada, varia de 0,5 – 1,2 (Meurer, 2000).

Outra característica dos argilo-minerais que afeta a magnitude da capacidade de troca de íons está relacionada à sua área superficial específica (ASE). No caso dos argilo-minerais expansíveis, tal como as esmectitas, a ASE é maior devido às superfícies internas entre as camadas. Na caulinita, a ASE é menor, pois esse argilo-mineral não é expansível e somente expõe a superfície externa (Meurer, 2000).

A tabela 3 traz valores de p_{cz} (Santana *et al.*, 2005) e ASE (Acros Organics, 2007) das argilas aqui estudadas.

Tabela 3 – Valores de p_{cz} e ASE dos argilo-minerais considerados neste estudado.

Argila	p_{cz}	ASE (m²/g)
Caulinita	4,52	20
Montmorilonita	1,47	10
Bentonita	1,88	240

1.5 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A adsorção dos íons em argilas pode ser representada, graficamente, por isotermas de adsorção, que relacionam a quantidade do íon adsorvido à fase sólida (θ) com sua concentração na solução (C_{sol}), numa determinada temperatura (T). Existem vários modelos de isotermas de adsorção, tais como, o de Langmuir e o modelo de Freundlich. O modelo de Langmuir sugere uma adsorção monocamada, sem nenhuma interação lateral entre as moléculas sorvidas. O modelo de Freundlich assume uma adsorção heterogênea devido à diversidade dos sítios de sorção ou a natureza diversa dos íons adsorvidos, espécies livres ou hidrolisadas (Sodré *et al.*, 2001; Namasivayam e Sangeetha, 2005).

O modelo de Langmuir é expresso pela seguinte equação linearizada:

$$C_{sol}/\theta = 1/Kb + C_{sol}/b$$

Onde K pode ser relacionado a energia de ligação e b a capacidade máxima de adsorção do íon na argila. Considerando C_{sol}/θ como variável dependente e C_{sol} como variável independente, obtêm-se os valores de K e b , onde $1/Kb$ é o coeficiente linear e $1/b$ é o coeficiente angular da reta (Sodré *et al.*, 2001; Namasivayam e Sangeetha, 2005).

A isoterma de Freundlich linearizada é expressa como:

$$\text{Log } \theta = \log K_f + 1/n \log C_{\text{sol}}$$

Onde **n** indica, qualitativamente, a reatividade dos sítios energéticos na argila e **K_f** pode sugerir a adsorção do íon no solo. No gráfico de **log θ** versus **log C_{sol}**, obtêm-se os valores de **K_f** e **n**, onde **log K_f** é o coeficiente linear e **1/n** é o coeficiente angular da reta (Sodré *et al.*, 2001; Namasivayam Sangeetha, 2005).

1.6 Adsorção de Biomoléculas Sobre Superfícies Minerais

Presume-se que o processo de adsorção é o primeiro estágio de uma grande variedade de reações prebióticas (Lahav, 1994) uma vez que, devido a sua superfície eletricamente carregada, argilo-minerais podem adsorver moléculas orgânicas provenientes da água ao redor, concentra-las muitas vezes e fornecer um ambiente catalítico de ocorrência natural para a formação de grandes moléculas, incluindo os blocos de construção da vida, os peptídeos/proteínas e moléculas informacionais auto-replicas, os nucleotídeos/RNA por exemplo (Bernal, 1951; Rao *et al.*, 1980; Cairns-Smith, 1982; Ferris, 1993).

1.6.1 Adsorção de aminoácidos sobre argilas

Desde que Bernal (1951) primeiramente sugeriu que argilo-minerais poderiam ter tido um papel importante na origem da vida, uma vez que, estes poderiam participar de processos tais como a seleção e a pré-concentração de monômeros a partir de uma solução diluída e, sua subsequente condensação para a formação de biopolímeros, diversos estudos vêm sendo realizados. Pode ser apontado que o estudo da formação de

aminoácidos e sua condensação para formar peptídeos/proteínas são importantes para a química prebiótica devido ao fato de que a maior parte das reações dos seres vivos atuais envolve aminoácidos/peptídeos/proteínas (Darnell *et al.*, 1990).

Numerosos artigos sobre a adsorção de aminoácidos em minerais/argilas/sedimentos têm sido publicados. Alguns exemplos são: Ala/Gly/Ser/Phe/His sobre β -FeOOH.Cl_n (Holm *et al.*, 1983); diversos aminoácidos sobre argilas (Paecht-Horowitz, 1978; Aufdenkampe *et al.*, 2001; Ding e Henrichs, 2002); Lys/Leu/Asp sobre dióxido de titânio (Rogacheva e Bobyrenko, 1985); aminoácidos sobre hidróxiapatita/calcita/albita (Tanaka *et al.*, 1989; Churchill *et al.*, 2004); Gly/Lys/Glu sobre hematita (Ben-Taleb *et al.*, 1994); vinte aminoácidos protéicos sobre sílica gel/poli A (Mellersh e Wilkinson, 2000); vários aminoácidos sobre diversos sedimentos de rio e do mar (Henrichs e Sugai, 1993; Aufdenkampe *et al.*, 2001; Montluçon e Lee, 2001; Ding e Henrichs, 2002) e diversos aminoácidos sobre sílica/quartzo/areia (Basiuk e Gromovoy, 1996; Basiuk, 2002; Zaia *et al.*, 2002; Churchill *et al.*, 2004). Em geral, todos estes artigos mostram que aminoácidos com grupo R carregado positivamente ou negativamente adsorvem mais que outros tipos de aminoácidos.

Um estudo publicado por Klappler (1977) tratando da ocorrência média de aminoácidos em aproximadamente 200 proteínas mostrou que as proteínas atuais são compostas por 74% de aminoácidos com grupo R não-carregado. Entretanto, baseado nos estudos anteriormente mencionados deveríamos esperar uma maior obtenção de peptídeos com grupo R carregado do que não-carregado, uma vez que, minerais adsorvem muito mais aminoácidos com grupo R carregado positivamente ou negativamente. Como discutido por Zaia *et al.*, 2002; Zaia, 2004; Zaia e Zaia, 2006 estes resultados levantam algumas dúvidas quanto ao papel dos minerais em fornecer um mecanismo de concentração de aminoácidos: quais foram os mecanismos envolvidos na produção de peptídeos/proteínas com muito mais aminoácidos com grupo R não-carregado do que carregado? Poderíamos esperar que a composição dos aminoácidos adsorvidos sobre minerais refletisse a das proteínas atuais? A adsorção de aminoácidos sobre minerais foi importante para a origem da vida? Entretanto, como apontado por Zaia (2004) e Zaia e

Zaia (2006) muitos dos estudos de adsorção de aminoácidos foram conduzidos em condições longe das reais.

A presente dissertação descreve a adsorção de aminoácidos (Ala, alanina; Met, metionina; Gln, glutamina; Cys, cisteína; Asp, ácido aspártico; Lys, lisina e His, histidina) sobre argilas (bentonita e caulim) em três faixas de pH (3,00, 6,00 e 8,00). Estes foram escolhidos de forma a representar as quatro classes principais de aminoácidos. Os aminoácidos foram dissolvidos em água do mar artificial contendo todos os elementos mais abundantes. Até onde sabemos, não existem artigos descrevendo a adsorção de aminoácidos em condições tão próximas da real como aqui utilizado, assim como a utilização de uma grande variedade de aminoácidos e uma larga faixa de pH. A presente dissertação também mostra um estudo da interação de aminoácidos/argilas usando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia Mössbauer e difratometria de raios-X.

1.6.2 Adsorção de bases nitrogenadas sobre argilas

Moléculas capazes de armazenar informação genética (RNA e DNA, por exemplo) são imprescindíveis para a evolução química que culminou com o surgimento da vida na Terra. A formação destas moléculas requereu condições muito específicas, incluindo a síntese e a concentração de precursores, a polimerização destes, sua proteção contra a degradação (forte radiação) e o seu potencial de multiplicar e evoluir (Franchi *et al.*, 2003).

Uma das tarefas da química prebiótica é tentar entender como essas bases nitrogenadas, uma vez formadas abióticamente na Terra primitiva, foram protegidas da degradação hidrolítica, ocasionando um aumento da taxa de produção/destruição, o que possibilitou a formação de nucleotídeos de ácidos nucléicos e, em última análise, a presença destes monômeros no material genético dos seres vivos.

Argilas são consideradas por muitos autores como tendo um papel importante na preservação e evolução de biomoléculas para o

surgimento da vida. As bases nitrogenadas formadas abioticamente seriam suscetíveis de degradação hidrolítica (Shapiro, 1995). A adsorção de bases nitrogenadas (presentes no material genético dos seres vivos) sobre a superfície de argilas poderia então protegê-las da hidrólise (Sowerby *et al.*, 2002a) e dos fótons UV altamente energéticos, capazes de quebrar ligações covalentes (Lahav, 1994).

Na literatura encontram-se diversos estudos sobre a adsorção das diversas bases nitrogenadas sobre diferentes sólidos inorgânicos. Entre estes trabalhos encontram-se, por exemplo, a adsorção de bases (purínicas e pirimidínicas) sobre: grafita (Heckl *et al.*, 1991; Sowerby *et al.*, 1996; Sowerby *et al.*, 1997; Sowerby *et al.*, 1999; Sowerby *et al.*, 2001a; Sowerby *et al.*, 2002a; Srinivasan *et al.*, 1991); dissulfeto de molibdênio (Sowerby *et al.*, 1996; Sowerby *et al.*, 1997; Sowerby *et al.*, 1999; Sowerby *et al.*, 2000; Heckl *et al.*, 1991); ouro cristalino (Tao *et al.*, 1993); argilas (Lahav e Chang, 1976; Perezgasga *et al.*, 2005; Winter e Zubay, 1995); platina (Saffarian *et al.*, 2001); zeólitas (Komiya *et al.*, 1998); pirita, quartzo, pirrotita, magnetita e fosterita (Cohn *et al.*, 2001); Em geral, todos estes estudos mostram que as bases nitrogenadas adsorvem espontaneamente a partir do meio aquoso sobre superfícies minerais, podendo ocorrer a formação de um arranjo ordenado das mesmas, estabilizado por ligações de hidrogênio entre as bases adjacentes e que podem possuir a complexidade aperiódica para codificar informação (Sowerby e Petersen, 2002b). Além disso, efeitos de temperatura e do tipo de sólido inorgânico devem ser levados em conta na disponibilidade prebiótica das bases nitrogenadas (Sowerby *et al.*, 2001b).

Nesta dissertação, a adsorção de bases nitrogenadas (**A**, adenina; **C**, citosina; **T**, timina e **U**, uracila) sobre argilas (caulim, bentonita e montmorilonita) foi estudada em duas faixas de pH (2,00 e 7,20). Estas bases foram escolhidas devido a sua presença no material genético dos seres vivos conhecidos. As bases nitrogenadas foram dissolvidas em água do mar artificial contendo todos os elementos mais abundantes. Dois modelos de isotermas de adsorção foram empregados neste estudo: Langmuir e Freundlich. Análises por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram conduzidas na tentativa de melhor compreender a interação das bases com a superfície mineral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Estudar a adsorção de aminoácidos e bases nitrogenadas sobre argilas em água do mar, em diversas faixas de pH.
- Estudar a interação de aminoácidos e bases nitrogenadas com argilas, utilizando diversas técnicas espectroscópicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a magnitude da adsorção de aminoácidos e bases nitrogenadas sobre argilas.
- Obter isotermas de adsorção das bases nitrogenadas sobre argilas, estimando os parâmetros de Langmuir e Freundlich.
- Correlacionar a magnitude da adsorção de aminoácidos e bases nitrogenadas sobre argilas com as variações de pH.
- Correlacionar os dados obtidos na adsorção de aminoácidos e bases nitrogenadas sobre argilas com a distribuição dos mesmos em proteínas e DNA/RNA dos seres vivos.
- Caracterizar a interação de grupamentos presentes nos aminoácidos e bases nitrogenadas com os sítios de adsorção da superfície do argilo-mineral por espectroscopia de infravermelho, espectroscopia Mössbauer e difratometria de raios-X.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Argilas

Todas as argilas foram utilizadas sem preparo prévio. O caulim foi doado pelo Dr. Carlos H. Sampaio do LAPROM/CT-UFRGS-RS. A montmorilonita e a bentonita foram adquiridas da Acros Organics-NJ, EUA. Caulim; Composição química: $\text{SiO}_2=45,7\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3=38,9\%$, $\text{Fe}_2\text{O}_3=0,3\%$, $\text{CaO}=0,1\%$, $\text{MgO}=0,1\%$, $\text{Na}_2\text{O}=0,1\%$, $\text{K}_2\text{O}=0,6\%$, $\text{TiO}_2=0,2\%$; área superficial = $20 \text{ m}^2/\text{g}$. Bentonita; Composição química: $\text{SiO}_2=73,0\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3=14,0\%$, $\text{Fe}_2\text{O}_3=2,7\%$, $\text{CaO}=0,2\%$, $\text{MgO}=1,1\%$, $\text{Na}_2\text{O}=0,6\%$, $\text{K}_2\text{O}=1,9\%$; área superficial = $240 \text{ m}^2/\text{g}$ (Acros Organics). Montmorilonita; composição química: $\text{SiO}_2=54,0\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3=17,0\%$, $\text{Fe}_2\text{O}_3=5,2\%$, $\text{CaO}=1,5\%$, $\text{MgO}=2,5\%$, $\text{Na}_2\text{O}=0,4\%$, $\text{K}_2\text{O}=1,5\%$; área superficial = $10 \text{ m}^2/\text{g}$ (Acros Organics).

3.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A).

3.1.3 Aminoácidos

Todos os L-aminoácidos foram adquiridos da Synth (Brasil) ou Nuclear (Brasil) e foram usados sem tratamento prévio. As abreviações para os aminoácidos são dadas de acordo com as recomendações da comissão IUPAC-

IUB para nomenclatura bioquímica: Ala, alanina; Met, metionina; Gln, glutamina; Cys, cisteína; Asp, ácido aspártico; Lys, lisina; His, histidina.

3.1.4 Bases Nitrogenadas

Todas as bases foram utilizadas sem tratamento prévio. Adenina (99,5%), citosina (99%) e timina (99%) foram adquiridas da Acros Organics (E.U.A.) e a uracila (mínimo 99%) da Sigma (Canada). As abreviações para as bases nitrogenadas são dadas de acordo com as recomendações da comissão IUPAC-IUB para nomenclatura bioquímica: **A**, Adenina; **C**, Citosina; **T**, Timina; **U**, Uracila.

3.1.5 Preparo de Amostras

3.1.5.1 Aminoácidos

Os aminoácidos (Ala, Met, Gln, Cys, Asp, Lys ou His) foram dissolvidos em água do mar na concentração de $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ e solução saturada. Cada tubo com argila (caulim ou bentonita) foi preparado como segue: em três séries diferentes de tubos de centrifuga de 15 mL (quadriplicatas) contendo 500 mg de argila (caulim ou bentonita) foram adicionados: a) 5,00 mL de água do mar; b) 5,00 mL de solução $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ de aminoácido (Ala, Met, Gln, Cys, Asp, Lys ou His) em água do mar; c) 5,00 mL de água do mar saturada de aminoácido (Ala, Met, Gln, Cys, Asp, Lys ou His). O pH foi ajustado a 3,00, 6,00 ou 8,00 pela adição de HCl ou NaOH. Os tubos foram agitados mecanicamente por 24 h; em seguida, foram centrifugados por 15 min a 2000 rpm; a fase aquosa foi então usada para análise de concentração de aminoácido enquanto que a fase sólida foi seca numa estufa a

40°C por 24 h e usada para análises de FT-IR. As amostras sólidas de bentonita/Cys foram também utilizadas na obtenção dos difratogramas de raios-x e dos espectros Mössbauer.

3.1.5.2 Bases Nitrogenadas

As bases nitrogenadas (**A**, **C**, **T** ou **U**) foram dissolvidas em água do mar na concentração de 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 720 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e solução saturada. As isotermas foram obtidas através da utilização de dois métodos.

Método 1: Variação da massa mantendo-se a concentração da base nitrogenada fixa. Cada série com argila (caulim, montmorilonita ou bentonita) foi preparada como segue: em cinco tubos de centrifuga de 15 mL (todos em duplicatas) foram adicionados diferentes massas de argila na faixa de 10 a 1500 mg e então foram adicionados: a) 5,00 mL de solução 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de base (**A**, **C**, **T** ou **U**), no caso das argilas bentonita e montmorilonita, ou b) 5,00 mL de solução 720 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de base (**A**, **C**, **T** ou **U**) no caso da argila caulim.

Método 2: Variação da concentração da base nitrogenada mantendo-se a massa de argila fixa. Cada série com argila (montmorilonita ou bentonita) foi preparada como segue: em cinco tubos de centrifuga de 15 mL (todos em duplicata) contendo 100 mg de argila (montmorilonita ou bentonita) foram adicionados 5,00 mL de solução de base (**T** ou **U**) em água do mar de concentração variando na faixa de 240 a 720 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O pH das amostras assim preparadas foi então ajustado a 2,00 ou 7,20 pela adição de HCl ou NaOH; os tubos foram agitados mecanicamente por 3 h para montmorilonita e bentonita e 16 h para o caulim mantendo a temperatura constante ($T = 40^\circ\text{C}$); em seguida, foram centrifugados por 15 min a 2000 rpm; a fase aquosa foi então usada para análise de concentração de base nitrogenada e a fase sólida foi seca numa estufa a 40°C por 24 h e usada para análises de FT-IR.

3.1.6 Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e reagentes de grau analítico (P.A) de acordo com cada metodologia citada.

Solução de água do mar: As seguintes substâncias foram pesadas e dissolvidas em um balão volumétrico de 1,0 L com água deionizada: 21,57 g de cloreto de sódio; 3,88 g de cloreto de magnésio; 1,787 g de sulfato de magnésio; 1,308 g de sulfato de cálcio; 0,832 g de sulfato de potássio; 0,124 g de carbonato de cálcio; 0,103 g de brometo de potássio e 0,0282 g de ácido bórico.

Solução de aminoácido ($240 \mu\text{g mL}^{-1}$): foram pesados 24,0 mg de aminoácido (Ala, Met, Gln, Cys, Asp, Lys ou His) e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, o volume foi completado com água do mar.

Solução de base nitrogenada ($240 \mu\text{g mL}^{-1}$): foram pesados 24,0 mg de base nitrogenada (A, C, T ou U) e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, o volume foi completado com água do mar.

Solução de base nitrogenada ($720 \mu\text{g mL}^{-1}$): foram pesados 72,0 mg de base nitrogenada (A, C, T ou U) e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, o volume foi completado com água do mar.

Solução de ninhidrina: foram pesados 0,60 g de ninhidrina e transferidos para um béquer. Em seguida, foram adicionados através de uma pipeta volumétrica 10,0 mL de etanol.

Solução de p-benzoquinona ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$): foram pesados 11,0 mg de p-benzoquinona para cada 1,0 mL de dimetilsulfóxido.

Solução tampão de fosfato (0,10 mol L⁻¹): foram pesados 6,90 g de fosfato de sódio monobásico e transferidos para um balão volumétrico de 500 mL. Em seguida, o volume foi completado com água deionizada e o pH ajustado para 6,00 mediante acréscimo de ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio.

Solução de ácido acético (0,10 mol L⁻¹): em um balão volumétrico foram diluídos 2,86 mL de ácido acético concentrado em água deionizada e o volume completado para 500 mL.

Solução de HCl (0,10 mol.L⁻¹): em um balão volumétrico foram diluídos 8,26 mL de HCl em água deionizada e o volume foi completado para 1,0 L.

Solução de HCl (1,0 mol.L⁻¹): em um balão volumétrico foram diluídos 82,6 mL de HCl em água deionizada e o volume foi completado para 1,0 L.

Solução de HCl (2,0 mol.L⁻¹): em um balão volumétrico foram diluídos 165,2 mL de HCl em água deionizada e o volume foi completado para 1,0 L.

Solução de HCl (3,0 mol.L⁻¹): em um balão volumétrico foram diluídos 247,8 mL de HCl em água deionizada e o volume foi completado para 1,0 L.

Solução de NaOH (0,01 mol.L⁻¹): foram pesados 0,40 g de NaOH e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 L. Em seguida, o volume foi completado com água deionizada.

Solução de NaOH (0,10 mol.L⁻¹): foram pesados 4,00 g de NaOH e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 L. Em seguida, o volume foi completado com água deionizada.

Solução de NaOH (1,0 mol.L⁻¹): foram pesados 40,00 g de NaOH e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 L. Em seguida, o volume foi completado com água deionizada.

Solução de NaOH (2,0 mol.L⁻¹): foram pesados 80,00 g de NaOH e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 L. Em seguida, o volume foi completado com água deionizada.

Solução de NaOH (3,0 mol.L⁻¹): foram pesados 120,00 g de NaOH e transferidos para um balão volumétrico de 1,0 L. Em seguida, o volume foi completado com água deionizada.

3.1.7 Equipamentos

Foram utilizados para a aquisição de dados: espectrofotômetros UV-Vis 1203 e FT-IR 8300 ambos da Shimadzu; espectrômetro Mössbauer convencional; difratômetro de raios-X Shimadzu D6000; potenciômetro CQA - pH 2000; balança analítica AND - HR 200; centrifuga QUIMIS - Q-222T1; agitador mecânico para tubos (movimento em vertical - 360°) e estufa Neuoni - NV 1,5.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Espectroscopia UV-Vis

Os aminoácidos (Ala, Met, Gln, Asp, Lys e His) foram quantificados utilizando o método da ninhidrina como descrito por Fisher *et al.* (1963) e Cys foi determinada usando o método da p-benzoquinona como descrito por Zaia *et al.* (1999). As bases nitrogenadas foram quantificadas por leitura direta na região UV (faixa de 260 – 270 nm). A quantidade de espécie adsorvida na argila foi calculada pela seguinte equação:

$$C_{\text{adsorvida}} = C_{\text{inicial}} - C_{\text{solução}}$$

$$C_{\text{solução}} = [(C_{\text{branco}})(\text{Abs}_{\text{amostra}})/(\text{Abs}_{\text{branco}})]$$

onde: C = concentração e Abs = absorvância.

3.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

Os espectros foram obtidos utilizando discos de KBr prensados e resolução espectral de 4 cm^{-1} sendo que cada espectro foi obtido após 120 aquisições. As análises foram conduzidas em amostras com e sem aminoácidos/bases adsorvidos como descrito anteriormente no preparo das amostras. Aproximadamente 10 mg de amostra e 200 mg de KBr foram pesados e então, triturados num almofariz com um pistilo até a completa homogeneização. Pastilhas foram preparadas e os espectros obtidos de 400 a 4000 cm^{-1} . Os espectros FT-IR foram analisados no programa Origin (5.0, 2001).

3.2.3 Difratomia de raios-X

Prepararam-se lâminas para análise de difração de raios-x pelo método do esfregaço. O material na forma de pó, de cada amostra, foi colocado na superfície de lâminas de vidro e, após adição de algumas gotas de água deionizada para umedecimento, foi orientado pressionando e deslizando suavemente outra lâmina de vidro sobre sua superfície, e em seguida foi colocado para secar a 25°C .

Difratogramas de raios-X foram obtidos no modo passo de 2 a $30^{\circ} 2\theta$, $0,6 \text{ s}$ a cada $0,02^{\circ} 2\theta$. O equipamento possui uma fonte de Cu e filtro de Ni. Após a análise das amostras originais, todas foram colocadas em um dessecador com etileno glicol líquido para expansão na presença da molécula

orgânica polar (Whitting e Allardice, 1986) por 24 h. Após, obteve-se nova leitura no difratômetro.

Os arquivos de cada difratograma foram utilizados para o cálculo do espaçamento basal (d_{001}) das bentonitas utilizando o software Grams/386 v 4.0 (Galactic Ind. Corp) assumindo um formato log-normal para os picos de reflexão.

3.2.4 Espectroscopia Mössbauer

A espectroscopia Mössbauer foi realizada na geometria de transmissão, em um espectrômetro Mössbauer convencional, operando em modo de aceleração constante. Os raios- γ foram obtidos de uma fonte $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$. Os espectros Mössbauer foram analisados por uma rotina de mínimos quadrados linear com forma de linha Lorentziana. Todos os dados de desvio isomérico (IS) são dados em relação ao $\alpha\text{-Fe}$ nesta dissertação.

3.2.5 Análise Estatística

Comparações entre as médias foram alcançadas utilizando: ANOVA e o teste Student-Newman-Keuls (teste S.N.K) ao nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ADSORÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOBRE ARGILAS

4.1.1 Adsorção

As tabelas 4 e 5 mostram a adsorção de aminoácidos (Ala, Met, Gln, Cys, Asp, Lys, His) dissolvidos em água do mar a diversas faixas de pH (3,00; 6,00 e 8,00) sobre caulim e bentonita respectivamente. Deve-se ressaltar que na literatura existem diversos trabalhos sobre a adsorção de aminoácidos sobre minerais, entretanto, dos trabalhos conhecidos, nenhum utiliza condições tão próximas da real quanto às utilizadas aqui. Os experimentos foram conduzidos sem a utilização de tampões e num grande intervalo de pH. A água do mar sintética usada neste trabalho contém todos os elementos de maior concentração presentes naturalmente.

A concentração de Ala (grupo R alifático não-polar), Cys (grupo R polar não-carregado) e Asp (grupo R carregado negativamente) adsorvidos sobre caulim assim como Cys e Asp adsorvidos sobre bentonita não sofreram alteração nos pHs estudados (tabelas 4 e 5) (S.N.K.>0,05). No caso do Asp isto pode ser devido ao fato de que o ponto isoelétrico $pI=2,77$, o $pK_a(-COOH)=1,88$ e o $pK_a(-NH_3^+)=9,60$ estão fora da faixa de pH estudados (Lehninger *et al.*, 1993). Como determinado por Santana *et al.* (2006) o ponto de carga zero (p_{cz}) para bentonita e caulim é de 1,88 e 4,52, respectivamente. Apesar do p_{cz} do caulim estar dentro da faixa de pH estudado aqui, deve-se notar que a determinação do p_{cz} depende da metodologia utilizada, o que, para o caulim

Tabela 4 – Quantidade em μg de aminoácidos adsorvidos em 500 mg de caulim em três faixas de pH.

Grupo-R	Aminoácido [#]	pH em tempo t=0*	Faixa de pH**	Quantidade adsorvida (μg)
Alifático não-polar	Alanina	3,00	2,56-3,45	192,3 \pm 21,8 (6) ^A
		6,00	5,45-7,02	163,3 \pm 10,6 (4) [□]
		8,00	7,70-8,41	243,2 \pm 31,7 (7) ^{β,γ,π,θ}
	Metionina	3,00	2,77-3,08	149,3 \pm 22,7 (6) ^{a,B,C}
		6,00	5,70-6,71	31,7 \pm 13,3 (7) ^a
		8,00	8,00-8,52	235,7 \pm 17,1 (5) ^{a,β,γ,π,χ}
Polar não-carregado	Glutamina	3,00	3,17-3,32	494,3 \pm 62,2 (4) ^{b,G}
		6,00	5,99-6,39	220,8 \pm 16,6 (4) ^{a,∇}
		8,00	7,86-8,54	397,1 \pm 48,7 (4) ^{b,α}
	Cisteína	3,00	2,67-3,11	1109,8 \pm 69,9 (4)
		6,00	6,53-6,72	1154,6 \pm 19,9 (5)
		8,00	8,06-8,34	1193,4 \pm 3,6 (5)
Carregado negativamente	Ácido Aspártico	3,00	2,45-3,35	429,3 \pm 31,9 (3) ^H
		6,00	6,53-6,72	268,5 \pm 13,4 (5) [□]
		8,00	7,80-8,25	321,5 \pm 56,5 (8) ^{β,ϕ}
Carregado positivamente	Lisina	3,00	2,82-3,07	219,1 \pm 46,1 (5) ^{b,B,D,E}
		6,00	5,32-5,63	453,9 \pm 19,7 (4) ^a
		8,00	7,86-8,26	318,0 \pm 13,4 (4) ^{b,β,γ,μ}
	Histidina	3,00	2,89-3,38	207,0 \pm 41,6 (7) ^{a,B,D,F}
		6,00	6,35-7,05	531,2 \pm 45,2 (5) ^a
		8,00	8,05-8,42	893,7 \pm 78,0 (7) ^a

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. O número de séries é dado entre parênteses com quatro amostras cada série. [#]Aminoácidos (1200 μg / 5,0 mL) foram dissolvidos em água do mar como descrito na metodologia. *pH ajustado em tempo t=0. **As faixas de pH após as amostras serem agitadas por 24 h. Teste SNK ($p < 0,05$) Teste ANOVA para Ala (F=2,19, P=0,149); Teste ANOVA para Met (F=32,79, P=0,000), teste SNK a/a; Teste ANOVA para Gln (F=8,85, P=0,007), teste SNK a/b; Teste ANOVA para Cys (F=1,28, P=0,317); Teste ANOVA para Asp (F=1,68, P=0,225); Teste ANOVA para Lys (F=12,43, P=0,002), teste SNK a/b; Teste ANOVA para His (F=35,80, P=0,000), teste SNK a/a. Para todos os aminoácidos na faixa de pH 3,00 teste ANOVA (F=55,16, P=0,000) e teste SNK ($p > 0,05$) A/B, C/D, E/F e G/H; Teste ANOVA para todos os aminoácidos na faixa de pH 6,00 (F=282,02, P=0,000) e teste SNK ($p > 0,05$) ∇/\square ; Teste ANOVA para todos os aminoácidos na faixa de pH 8,00 (F=50,61, P=0,000) e teste SNK ($p > 0,05$) α/β , ϕ/γ , μ/π e θ/χ .

Tabela 5 – Quantidade em μg de aminoácidos adsorvidos em 500 mg de bentonita em três faixas de pH.

Grupo-R	Aminoácido [#]	PH em tempo t=0*		Quantidade adsorvida (μg)
		Faixa de pH**		
Alifático não-polar	Alanina	3,00	2,48-3,21	245,1 \pm 35,0 (5) ^{b,E}
		6,00	6,04-6,53	147,4 \pm 13,9 (5) ^a
		8,00	7,50-8,50	260,6 \pm 22,4 (6) ^{b,α}
Polar não-carregado	Metionina	3,00	2,73-3,12	521,3 \pm 59,4 (7) ^{a,B,C}
		6,00	5,90-6,69	293,1 \pm 32,7 (6) ^{a,∇}
		8,00	8,15-8,48	672,9 \pm 43,4 (5) ^a
	Glutamina	3,00	2,79-3,82	266,1 \pm 11,3 (6) ^{b,F}
		6,00	6,33-6,83	321,1 \pm 42,6 (7) ^{b,\square}
		8,00	7,84-8,33	508,6 \pm 22,5 (4) ^{a,ϕ}
Cisteína	3,00	2,81-2,93	1185,8 \pm 14,2 (3)	
	6,00	6,00-6,22	1155,7 \pm 10,6(5)	
	8,00	8,24-8,42	1173,5 \pm 16,0 (5)	
Carregado negativamente	Ácido Aspártico	3,00	2,65-2,96	607,2 \pm 38,6 (4) ^A
		6,00	6,55-6,95	468,2 \pm 42,6 (4)
		8,00	7,95-8,25	477,2 \pm 44,8 (6) ^{γ}
Carregado positivamente	Lisina	3,00	2,83-2,89	785,4 \pm 39,4 (6) ^b
		6,00	6,44-6,95	806,0 \pm 35,5 (5) ^b
		8,00	8,00-8,32	1007,4 \pm 12,2 (4) ^a
	Histidina	3,00	2,46-3,37	551,6 \pm 41,0 (5) ^{a,B,D}
		6,00	6,74-7,94	928,6 \pm 42,9 (6) ^a
		8,00	8,02-8,32	273,1 \pm 21,5 (5) ^{a,β}

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. O número de séries é dado entre parênteses com quatro amostras cada série. [#]Aminoácidos (1200 μg / 5,0 mL) foram dissolvidos em água do mar como descrito na metodologia. *pH ajustado em tempo t=0. **As faixas de pH após as amostras serem agitadas por 24 h. Teste SNK ($p < 0,05$) Teste ANOVA para Ala (F=5,90, P=0,015), teste SNK a/b.; Teste ANOVA para Met (F=13,99, P=0,000), teste SNK a/a; Teste ANOVA para Gln (F=12,06, P=0,000), teste SNK a/b; Teste ANOVA para Cys (F=1,07, P=0,380); Teste ANOVA para Asp (F=2,82, P=0,103); Teste ANOVA para Lys (F=10,91, P=0,002), teste SNK a/b; Teste ANOVA para His (F=79,09, P=0,000), teste SNK a/a. Teste ANOVA para todos os aminoácidos na faixa de pH 3,00 (F=44,02, P=0,000) e teste SNK ($p > 0,05$) A/B, C/D e E/F; Teste ANOVA para todos os aminoácidos na faixa de pH 6,00 (F=109,49, P=0,000) e teste SNK ($p > 0,05$) ∇/\square ; Teste ANOVA para todos os aminoácidos na faixa de pH 8,00 (F=127,0, P=0,000) e teste SNK ($p > 0,05$) α/β e ϕ/γ .

estes valores podem variar de 2,7 a 4,5 (Parks, 1967; Appel *et al.*, 2003; Santana *et al.*, 2006). Assim, o p_{cz} para ambas as argilas pode estar fora da faixa de pH usada neste trabalho, o que indicaria (no caso de $p_{cz} < 3,00$) uma carga superficial negativa em todas as faixas estudadas. Também devemos destacar que o pK_R para o Asp é de 3,65 e na faixa de pH 3,00 para ambas as argilas a adsorção de Asp foi pouco maior que a das outras faixas de pH

(tabela 4 e 5). Assim, a adsorção constante de Asp sobre argilas (caulim e bentonita) observada na faixa de pH (3,00 – 8,00) foi provavelmente devido a constante carga superficial das argilas (carga negativa) e das moléculas de Asp – $^{-}\text{OOC}(\text{CH}_2)(\text{H})\text{C}_\alpha(\text{NH}_3^+)\text{COO}^{-}$. Rogacheva e Bobyrenko (1985) estudaram a adsorção de alguns aminoácidos, incluindo o Asp, sobre dióxido de titânio e observaram que a adsorção diminui com o aumento do pH. Entretanto, Ben-Taleb *et al.* (1994) mostraram que a adsorção de Glu (grupo R carregado negativamente) sobre hematita foi máxima em pH próximo ao p_I do aminoácido.

A quantidade de Cys (grupo R polar não-carregado) adsorvida sobre o caulim e bentonita (tabelas 4 e 5) não se alterou com a variação de pH, provavelmente devido à elevada capacidade de adsorção deste aminoácido sobre minerais, tal como apontado por Basiuk (2002), o grupo tiol da Cys diminui o $\Delta G^\circ_{\text{ads}}$, e conseqüentemente, aumenta a adsorção deste aminoácido.

Não há uma explicação simples para a não variação da adsorção de Ala sobre o caulim com o pH (tabela 4). Tanaka *et al.* (1989) também mostraram que a adsorção de Ala sobre hidróxiapatita foi praticamente independente do pH da solução. Grzegorzczuk e Carta (1996) estudaram a adsorção de alguns aminoácidos (Leu, grupo R não-polar; Phe, Grupo R aromático; Try, grupo R aromático) sobre uma série de adsorventes poliméricos porosos e mostraram que as isotermas são essencialmente independentes do pH.

A adsorção de Met e Gln, ambos os aminoácidos com grupos R não- carregados, sobre o caulim e também Ala e Met sobre bentonita na faixa de pH 6,00 foi menor que nas outras faixas estudadas (pH 3,00 e 8,00) (S.N.K.<0,05) (tabelas 4 e 5). Há de se observar que um mínimo na magnitude da atração ou repulsão eletrostática pode ocorrer próximo do p_{cz} das argilas e do p_I dos aminoácidos em sistemas onde a adsorção é governada por interações eletrostáticas (Churchill *et al.*, 2004). Assim, com os valores de p_I para Met e Gln, 5,74 e 5,65 (tabela 1) respectivamente, e considerando-se o valor de p_{cz} para o caulim de 4,52 (tabela 3) podemos entender que em pH 6,00 ocorre um mínimo da atração entre Met, Gln e caulim. A adsorção de Gln (grupo R polar não-carregado) sobre bentonita na faixa de pH 8,00 foi maior do que em outras faixas de pH (3,00 e 6,00) (S.N.K.<0,05) (tabela 5). Diversos

outros estudos também mostram a influência do pH sobre a adsorção de aminoácidos em superfícies de sólidos inorgânicos. Rogacheva e Bobyrenko (1985) mostraram que a adsorção de Leu (grupo R alifático não-polar) sobre dióxido de titânio diminuiu com o aumento do pH. Por outro lado, Ben-Taleb *et al.* (1994), Kalra *et al.* (2000) e Basiuk (2002) obtiveram uma adsorção máxima de Ala, assim como outros aminoácidos sobre hematita (Ala, Gly, Lys, Thr e Glu), montmorilonita (Ala e Gly) e sílica pura, próximo do pI do aminoácido. Meng *et al.* (2004) também observaram que a adsorção de Gly (pI = 5,97; grupo R alifático não-polar) sobre sílica foi máxima em pH 6,00 (Lehninger *et al.*, 1993).

A adsorção de Lys (grupo R carregado positivamente) sobre o caulim na faixa de pH 6,00 foi maior que nas outras faixas (3,00 e 8,00) (S.N.K.<0,05) (tabela 4). Por outro lado, a adsorção de Lys sobre bentonita na faixa de pH 8,00 foi maior que nas outras faixas de pH (3,00 e 6,00) (S.N.K.<0,05) (tabela 5). Churchill *et al.* (2004) também observaram que a adsorção de Lys (pI=9,74) sobre quartzo ($p_{cz}=2,8$) aumenta quando os valores de p_{cz} e pI diferem significativamente. Este resultado concorda com o resultado obtido aqui para o caso Lys/bentonita ($p_{cz}=1,88$) onde há um aumento da adsorção com o distanciamento dos valores de pI e p_{cz} . Rogacheva e Bobyrenko (1985) mostraram que a adsorção de Lys sobre dióxido de titânio diminuiu com o aumento de pH. Por outro lado, Ben-Taleb *et al.* (1994) obtiveram uma adsorção máxima de Lys sobre hematita em pH próximo ao pI do aminoácido.

A adsorção de His (grupo R carregado positivamente) sobre o caulim aumentou com o aumento do pH (S.N.K.<0,05) (tabela 4). Entretanto, a adsorção de His sobre bentonita aumentou da faixa de pH 3,00 a 6,00 e diminuiu novamente na faixa de pH 8,00 a um valor menor que o obtido em pH 3,00 (S.N.K.<0,05) (tabela 5).

Os aminoácidos que mostraram as maiores adsorções ($k>1$, onde $k=C_{ads}/C_{sol}$) sobre caulim ou bentonita foram: Cys (ambas as argilas e em todas as faixas de pH), Met (bentonita pH 8,00), Asp (bentonita pH 3,00), His (caulim pH 8,00; bentonita pH 6,00) e Lys (bentonita todas as faixas) (tabelas 4 e 5).

Em geral, pode-se dizer que aminoácidos com grupo R carregado (Asp, Lys e His) e Cys (grupo R polar não-carregado) foram mais adsorvidos sobre caulim ou bentonita que os outros aminoácidos (Ala, Met e Gln) (tabelas 4 e 5; figura 5). Importante notar que a adsorção de Cys foi estudada somente sobre sílica pura e C18 (Basiuk e Gromovoy, 1996; Basiuk, 2002) e sílica gel/poliA (Mellersh e Wilkinson, 2000).

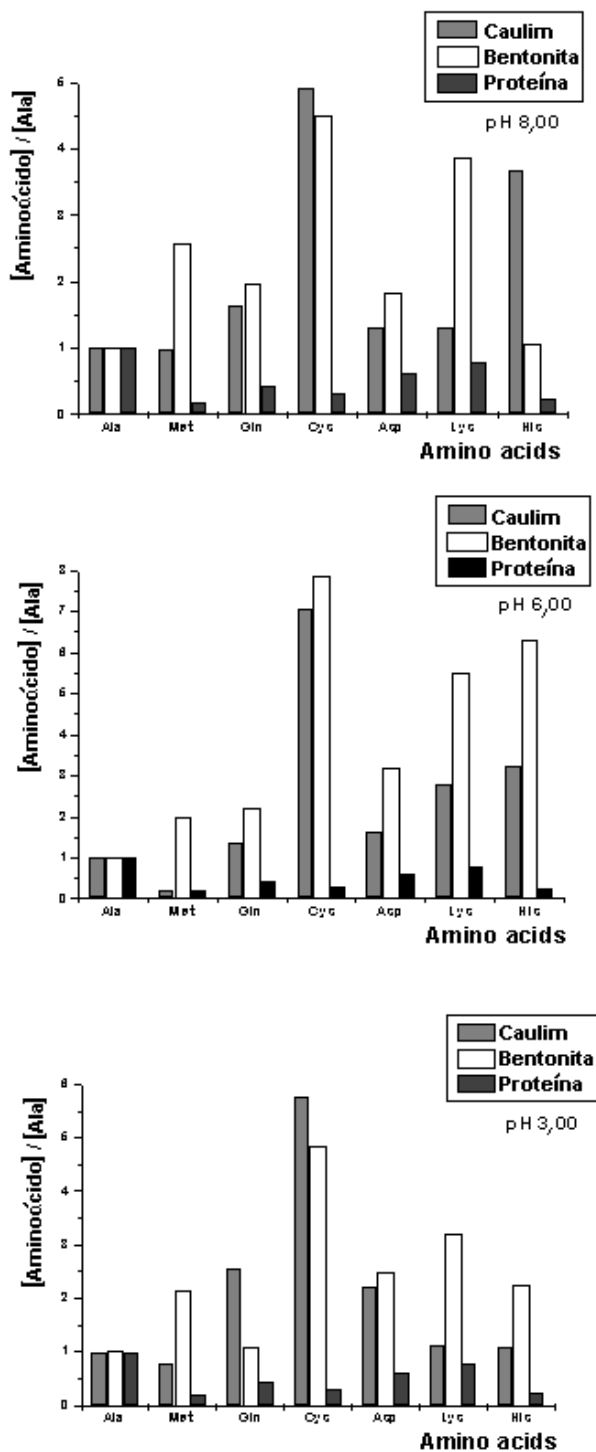


Figura 5 – Concentração relativa de todos os aminoácidos. A quantidade de Ala adsorvida em caulinita ou bentonita ou a ocorrência em proteínas (Klapper, 1977) foi tomada como 1,00.

Um artigo de revisão publicado por Lahav e Chang (1976) e vários outros artigos citados na introdução mostram o resultado da adsorção de alguns aminoácidos sobre argilas, minerais e sedimentos. Em quase todos os casos, aminoácidos com grupos carregados negativamente ou positivamente são mais adsorvidos que outros tipos de aminoácidos.

Um estudo publicado por Klapper (1977) sobre a ocorrência média de aminoácidos em 200 proteínas mostrou que 74% dos aminoácidos das proteínas atuais contêm grupos R não-carregados (Cys 2,8%). Entretanto, baseado em nossos resultados, tão bem quanto em outros resultados publicados, deveria se esperar uma maior ocorrência de peptídeos consistindo de aminoácidos com grupos R carregados e Cys do que de aminoácidos contendo grupo R não-carregado, uma vez que, minerais adsorvem muito mais aminoácidos com grupo R carregado negativamente ou positivamente e Cys.

Como discutido em outros artigos, estes resultados levantam algumas questões sobre o papel dos minerais em fornecer um mecanismo para concentração de aminoácidos: quais foram os mecanismos envolvidos na produção de peptídeos/proteínas com mais aminoácidos contendo grupo R não-carregado do que grupo R carregado e Cys? Poderíamos esperar que a composição dos aminoácidos adsorvidos sobre minerais refletisse a das proteínas atuais? A adsorção de aminoácidos sobre minerais foi importante para a origem da vida? (Zaia *et al.*, 2002; Zaia, 2004; Zaia e Zaia, 2006). Zaia (2004) e Zaia e Zaia (2006) propuseram alguns mecanismos que poderiam estar envolvidos na produção de peptídeos/proteínas compostos por maior quantidade de aminoácidos com grupo R não-carregado do que com grupo R carregado. Entre estes mecanismos: membranas lipossômicas (Böhler *et al.*, 1996; Blocher *et al.*, 1999; Blocher *et al.*, 2000; Luisi *et al.*, 2000); adsorção de aminoácidos por bases purínicas pré-adsorvidas sobre grafita pura (Sowerby *et al.*, 2002a) e ciclos de hidratação/desidratação (Yanagawa *et al.*, 1990; Suwannachot e Rode, 1999; Plankensteiner *et al.*, 2002). Andersson e Holm (2000) estudaram a estabilidade de Asp, Ser, Leu e Ala em condições encontradas em hidrotermais (tamponadas e não-tamponadas com minerais, 200°C, 50 bar). Entre os quatro aminoácidos, Ala foi o mais estável, onde o tempo de meia vida no experimento não-tamponado foi de 27 h e no experimento tamponado de 380 h. Também observaram que nos estágios

iniciais do experimento, a concentração de Ala aumentou provavelmente devido à desidratação da serina, o que também foi responsável pela formação de Gln, o qual não estava presente inicialmente. Outros aminoácidos deveriam também ser testados, entretanto, este experimento pode explicar porque Ala é o mais abundante aminoácido em proteínas (figura 5) (Klapper, 1977).

4.1.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR) das amostras aminoácidos/ argilas

Foi realizado um estudo por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) para melhor entender a interação entre argilas e aminoácidos. Para todos os aminoácidos (Ala, Met, Gln, Cys, Asp, Lys e His) adsorvidos sobre argilas (bentonita e caulim), não houve alteração dos espectros FT-IR com a mudança de pH (faixa 3,00 – 8,00) (dados não mostrados).

A figura 6 mostra os espectros do caulim, bentonita, Ala sólida e Ala adsorvida em caulim e bentonita. O espectro FT-IR da Ala sólida (figura 6-A-b e 6-B-b) mostram bandas em 1520/1593 e 3082 cm^{-1} que podem ser atribuídas a deformação assimétrica do $-\text{NH}_3^+$ e ao estiramento $-\text{NH}_3^+$, respectivamente (Stewart e Fredericks, 1999; Wolpert e Hellwig, 2006). O espectro da Ala adsorvida em bentonita (figura 6-A-c) mostra um pequeno deslocamento nas frequências e as seguintes alterações: bandas em 1520/1593 cm^{-1} desapareceram, banda em 3082 cm^{-1} diminuiu de intensidade, e uma nova banda foi observada em 3305 cm^{-1} devido ao grupo $-\text{NH}_3^+$ adsorvido na bentonita. Isto poderia explicar a banda em 1461 cm^{-1} que pode estar relacionada à deformação $-\text{NH}_3^+$. Estes resultados foram também obtidos por Nabiev *et al.* (1983) e Suh e Moskovits (1986) que identificaram os grupos carbonil ($-\text{COO}^-$) e amina ($-\text{NH}_3^+$). O espectro da Ala adsorvida em caulim (figura 6-B-c) mostra uma diminuição na intensidade da banda em 1593 cm^{-1} e o estiramento do NH_3^+ foi observado em 3082 cm^{-1} . Isto significa que a interação Ala/caulim foi bastante fraca comparada a Ala/bentonita.

A figura 7 mostra os espectros FT-IR do caulim, bentonita, Asp sólido e Asp adsorvido em caulim e bentonita. Não foi possível obter bons espectros do Asp adsorvido nas argilas devido à baixa relação sinal/ruído.

A figura 8 mostra o espectro FT-IR do caulim, bentonita, Lys sólida e Lys adsorvida em caulim e bentonita. O espectro FT-IR da Lys sólida (figura 8-A-b e 8-B-b) mostra bandas em 1505, 1593/1614, 1566 e 3160 cm^{-1} que podem ser atribuídas à deformação simétrica do $-\text{NH}_3^+$, deformação assimétrica do $-\text{NH}_3^+$ estiramento simétrico do COO^- e estiramento do $-\text{NH}_3^+$, respectivamente (Stewart e Fredericks, 1999; Wolpert e Hellwig, 2006). O espectro da Lys adsorvida em bentonita (figura 8-A-c) mostra um pequeno deslocamento de frequência. Algumas outras alterações foram observadas tais como: diminuição

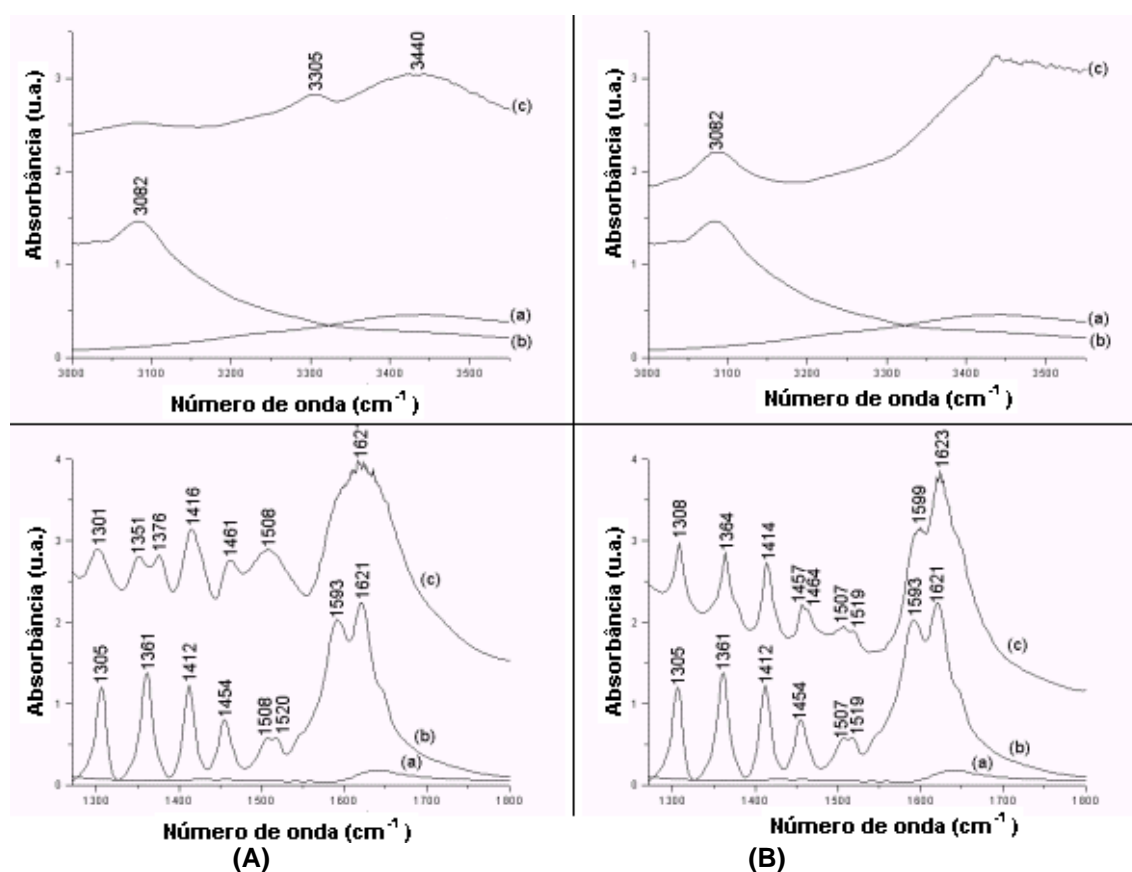


Figura 6 – Espectro FT-IR de: **(A)** bentonita (a), alanina sólida (b) e alanina adsorvida em bentonita (c); **(B)** caulim (a), alanina sólida (b) e alanina adsorvida em caulim (c). As amostras com argila foram agitadas por 24 h com água do mar e solução saturada de alanina em água do mar. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 r.p.m., e o sólido seco em estufa a 40 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

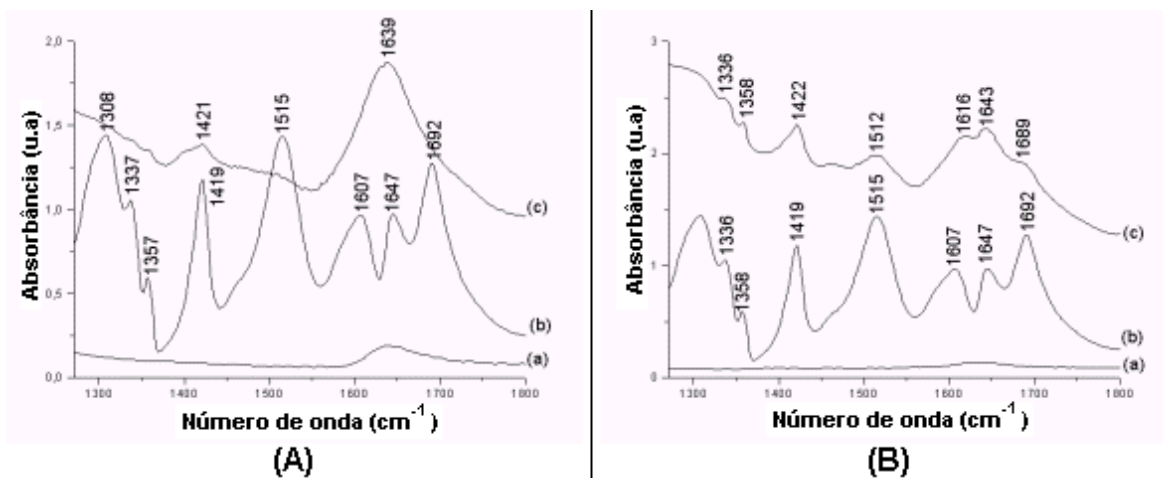


Figura 7 – Espectro FT-IR de: **(A)** bentonita (a), ácido aspártico sólido (b) e ácido aspártico adsorvido em bentonita (c); **(B)** caulim (a), ácido aspártico sólido (b) e ácido aspártico adsorvido em caulim (c). As amostras com argila foram agitadas por 24 h com água do mar e solução saturada de ácido aspártico em água do mar. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 r.p.m., e o sólido seco em estufa a 40 °C por 24 h.

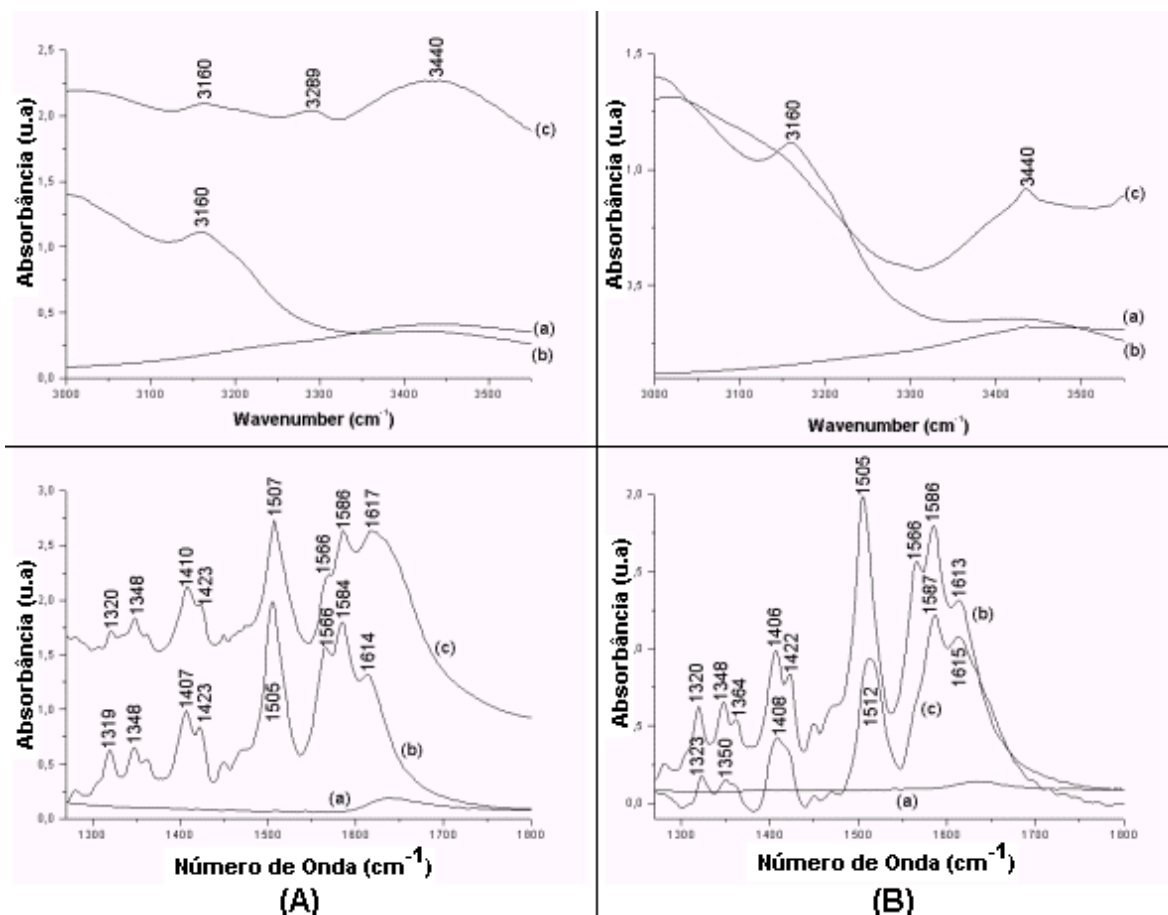


Figura 8 – Espectro FT-IR de: **(A)** bentonita (a), lisina sólida (b) e lisina adsorvida em bentonita (c); **(B)** caulim (a), lisina sólida (b) e lisina adsorvida em caulim (c). As amostras com argila foram agitadas por 24 h com água do mar e solução saturada de lisina em água do mar. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 r.p.m., e o sólido seco em estufa a 40 °C por 24 h.

da intensidade das bandas em 1566 e 3160 cm^{-1} , alargamento da banda em 1505 cm^{-1} e uma nova banda em 3289 cm^{-1} (figura 8-A-c). Esta nova banda pode ser atribuída ao grupo $-\text{NH}_3^+$ adsorvido em bentonita. Isto explicaria o alargamento da banda em 1505 cm^{-1} devido à presença da deformação $-\text{NH}_3^+$. O espectro da Lys adsorvida em caulim (figura 8-B-c) mostra um deslocamento de frequência de 1505 a 1512 cm^{-1} e o desaparecimento da banda em 1566 cm^{-1} . Esta última pode ser atribuída a deformação da Lys sobre a superfície do caulim. Este resultado mostra, também, que a interação Lys/caulim ocorre através do grupo $-\text{NH}_3^+$.

A figura 9 mostra os espectros FT-IR do caulim, bentonita, His sólida e His adsorvida em caulim e bentonita. O espectro FT-IR da His sólida

(figura 9-A-b e 9-B-b) mostra bandas em 1271/1315/1571/1589, 1461, 1499, 1632 e 3157 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao estiramento aromático C-C e N-C deformação do CH_2 e estiramento C-C do anel, deformação simétrica $-\text{NH}_3^+$, deformação assimétrica $-\text{NH}_3^+$ e estiramento $-\text{NH}_3^+$, respectivamente (Stewart e Fredericks, 1999; Wolpert e Hellwig, 2006). O espectro da His adsorvida em bentonita (figura 9-A-c) mostra o desaparecimento das bandas em 1461, 1571 e 1589 cm^{-1} e o aparecimento de uma nova banda em 3263 cm^{-1} . Este desaparecimento pode ser atribuído a deformação do anel da His em bentonita e a falta de carga positiva sobre o nitrogênio imidazólico. A nova banda pode ser atribuída ao grupo $-\text{NH}_3^+$ adsorvido em bentonita. Pode-se observar que a banda em 1499 cm^{-1} mostra um alargamento. Nas faixas de pH estudado, os espectros FT-IR não se alteraram, no entanto, Martusevičius *et al.* (1996) observaram duas espécies na faixa de pH 3,00 a 8,00. O espectro da His adsorvida em caulim (figura 9-B-c) mostra o desaparecimento das bandas em

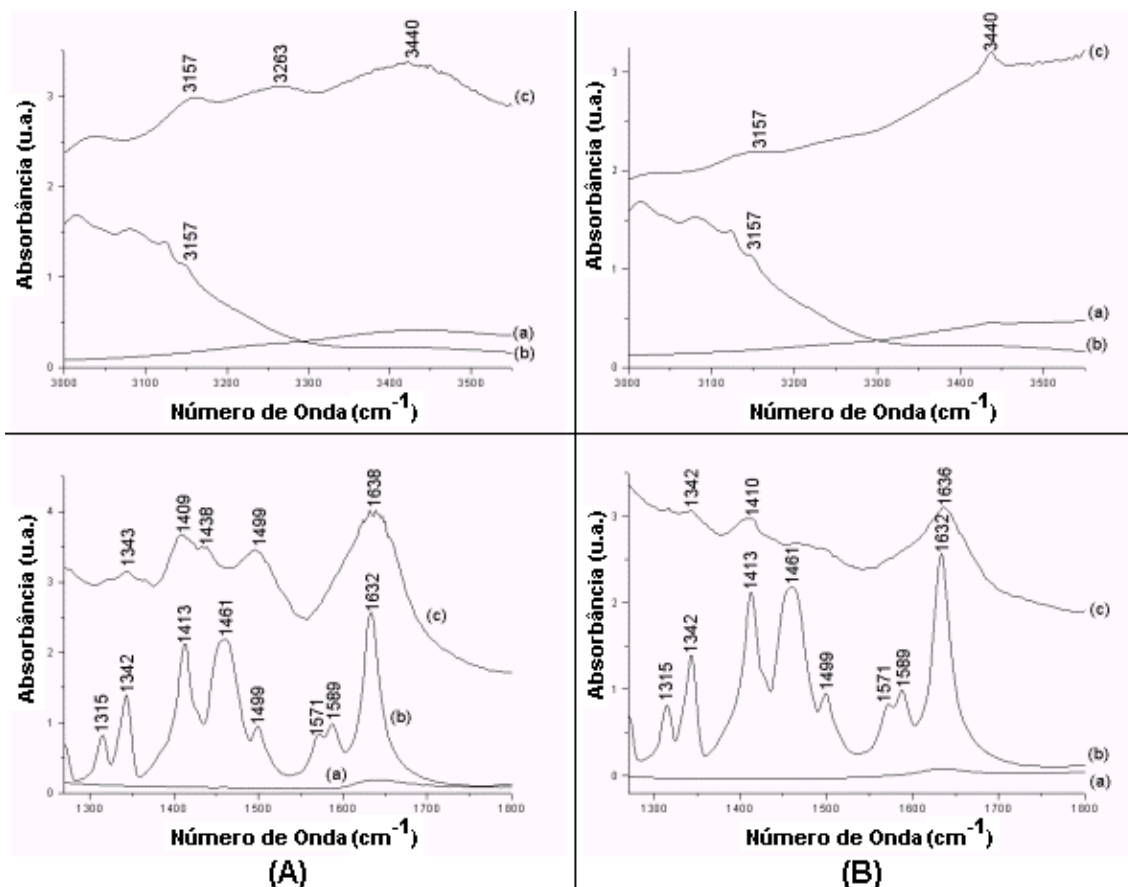


Figura 9 – Espectro FT-IR de: **(A)** bentonita (a), histidina sólida (b) e histidina adsorvida em bentonita (c); **(B)** caulim (a), histidina sólida (b) e histidina adsorvida em caulim (c). As amostras com argila foram agitadas por 24 h com água do mar e solução saturada de histidina em água do mar. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 r.p.m., e o sólido seco em estufa a 40°C por 24 h.

1461, 1499, 1571 e 1589 cm^{-1} e diminuição da banda em 3157 cm^{-1} . Estes resultados mostram que a interação His/caulim também ocorre através do grupo $-\text{NH}_3^+$.

A figura 10 mostra o espectro FT-IR do caulim, bentonita, Met sólida e Met adsorvida em caulim e bentonita. O espectro FT-IR da Met sólida (figura 10-A-b e 10-B-b) apresenta bandas em 1317, 1352/1446, 1409, 1510, 1563/1584-1612 e 3165 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao grupo CH_2 , deformação simétrica/assimétrica do CH_3 , estiramento simétrico do COO^- , deformação assimétrica do $-\text{NH}_3^+$, deformação do NH_2 e estiramento do $-\text{NH}_3^+$, respectivamente (Stewart e Fredericks, 1999; Wolpert e Hellwig, 2006). O estiramento C-S não foi observado no espectro da Met sólida, devido à baixa

relação sinal/ruído. No espectro da Met adsorvida em bentonita as seguintes alterações foram observadas: desaparecimento das bandas em 1317, 1409, 1446, 1563, 1584, 1612 e 3165 cm^{-1} , surgimento de uma nova banda em 3277 cm^{-1} e deslocamento da banda em 1510 para 1501 cm^{-1} . Para as amostras de Met adsorvidas em caulim, o espectro mostra um pequeno deslocamento das frequências e diminuição de intensidade (figura 10-b-c). A interação da Met adsorvida em ambas as argilas ocorre através do grupo amino e o átomo de enxofre não está envolvido em nenhuma interação por estar bloqueado pelo grupo $-\text{CH}_3$ (figura 10-A-c e 10-B-c).

A figura 11 mostra o espectro de FT-IR do caulim, bentonita, Gln sólida e Gln adsorvida em caulim e bentonita. O espectro FT-IR da glutamina sólida (figura 11-A-b e 11-B-b) apresenta bandas em 1412, 1449, 1488, 1587, 1687, 3174, 3213-3275 e 3321/3407 cm^{-1} que podem ser atribuídas à deformação do grupo CH, deformação do grupo CH_2 , estiramento simétrico do $-\text{NH}_3^+$,

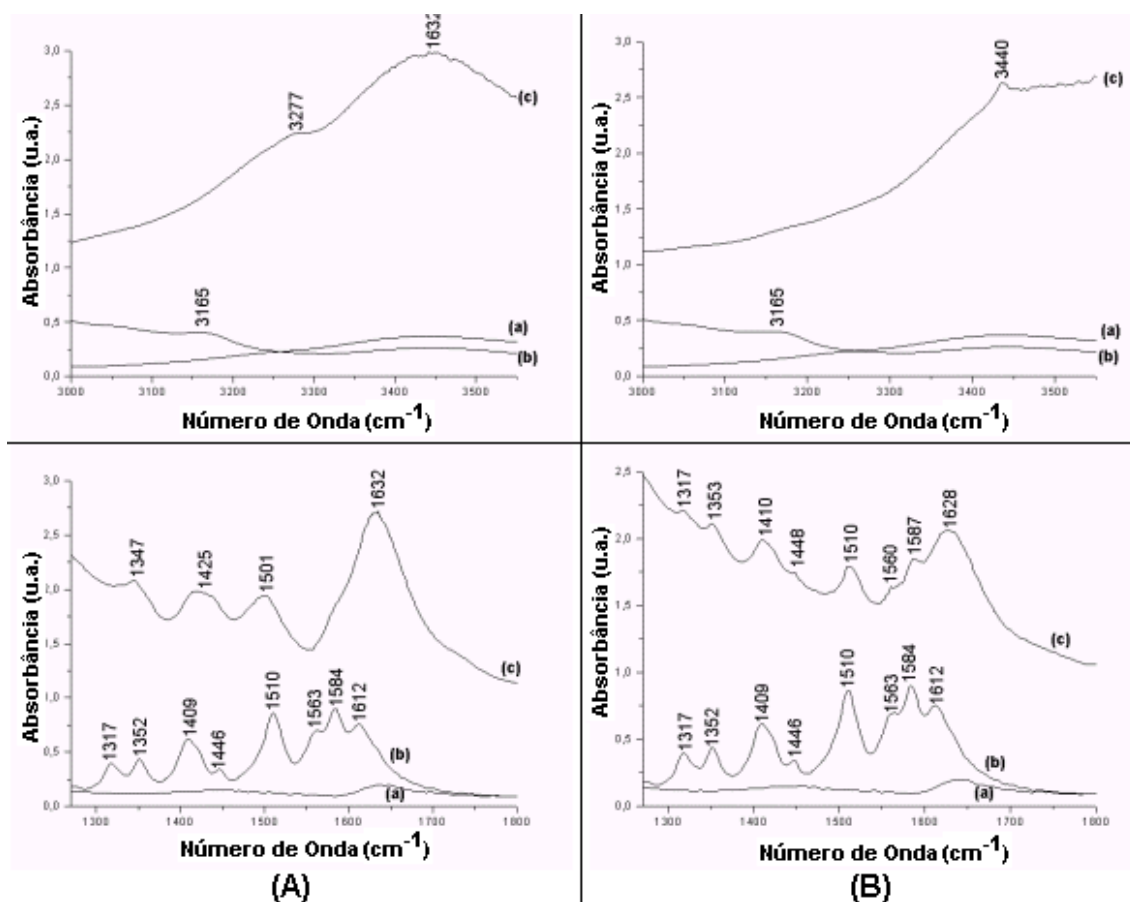


Figura 10 – Espectro FT-IR de: (A) bentonita (a), metionina sólida (b) e metionina adsorvida em bentonita (c); (B) caulinita (a), metionina sólida (b) e metionina adsorvida em caulinita (c). As amostras com argila foram agitadas por 24 h com água do mar e solução saturada de metionina em água do mar. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 r.p.m., e o sólido seco em estufa a 40°C por 24 h.

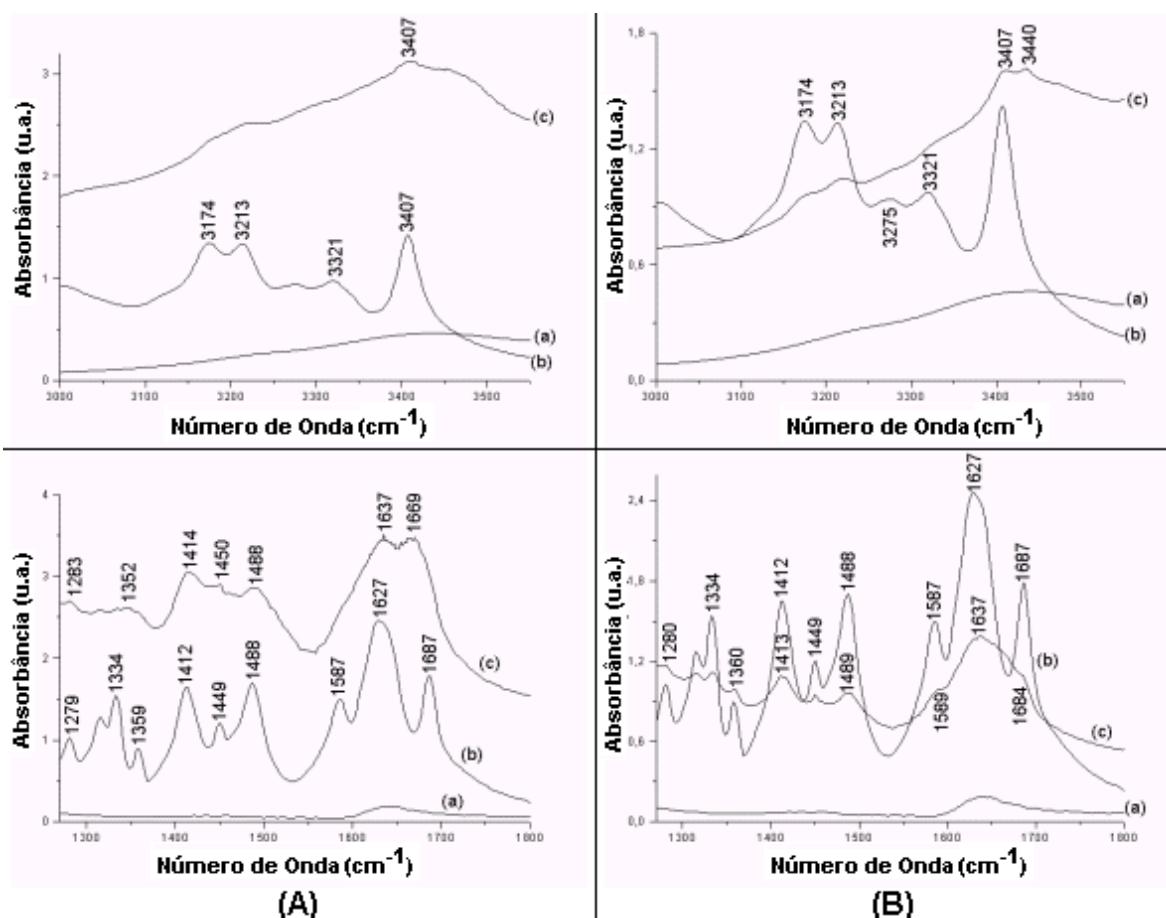


Figura 11 – Espectro FT-IR de: **(A)** bentonita (a), glutamina sólida (b) e glutamina adsorvida em bentonita (c); **(B)** caulinita (a), glutamina sólida (b) e glutamina adsorvida em caulinita (c). As amostras com argila foram agitadas por 24 h com água do mar e solução saturada de glutamina em água do mar. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 r.p.m., e o sólido seco em estufa a 40°C por 24 h.

deformação do grupo NH_2 e estiramento assimétrico do COO^- , estiramento do grupo C=O , estiramento de $-\text{NH}_3^+$, estiramento simétrico do grupo NH_2 e estiramento assimétrico do grupo NH_2 , respectivamente (Stewart e Fredericks, 1999; Wolpert e Hellwig, 2006). No espectro da Gln adsorvida em bentonita, a banda em 1587 cm^{-1} desaparece provavelmente devido à mudança de NH_2 para NH_3^+ pela interação de um par de elétrons do grupo NH_2 com a superfície da argila. Neste espectro, também observamos um pequeno deslocamento de freqüências e uma diminuição na intensidade de algumas bandas, tal como em 1488 cm^{-1} (figura 11-A-c). Para as amostras adsorvidas em caulim, o espectro

mostra um pequeno deslocamento nas frequências e diminuição das intensidades (figura 11-B-c). A interação da Gln adsorvidas em ambas as argilas ocorreu através do grupo amino.

A figura 12 mostra os espectros FT-IR do caulim, bentonita, Cys sólida e Cys adsorvida em caulim e bentonita. O espectro FT-IR da Cys sólida (figura 12-A-b 12-B-b) apresenta bandas em 646/838, 679, 776/1429, 869, 1347, 1398, 1521, 1572, 1623, 1644 e 1741 cm^{-1} que podem ser atribuídas a deformação do grupo COO^- , estiramento do grupo C-S, deformação do grupo CH_2 , estiramento C-C, deformação simétrica do grupo NH_3 , estiramento simétrico do COO^- , deformação do grupo N-H, deformação assimétrica de $-\text{NH}_3^+$, deformação assimétrica de $-\text{NH}_3^+$, estiramento assimétrico COO^- e estiramento C=O, respectivamente (Stewart e Fredericks, 1999; Wolpert e Hellwig, 2006). A banda fraca próxima a 2561 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo S-H na molécula de Cys (Pawlukojé *et al.*, 2005; Aryal *et al.*, 2006; Wolpert e Hellwig, 2006). Na região 3000-3600 cm^{-1} os espectros não estão bem definidos devido à baixa relação sinal/ruído. O espectro da Cys adsorvida em

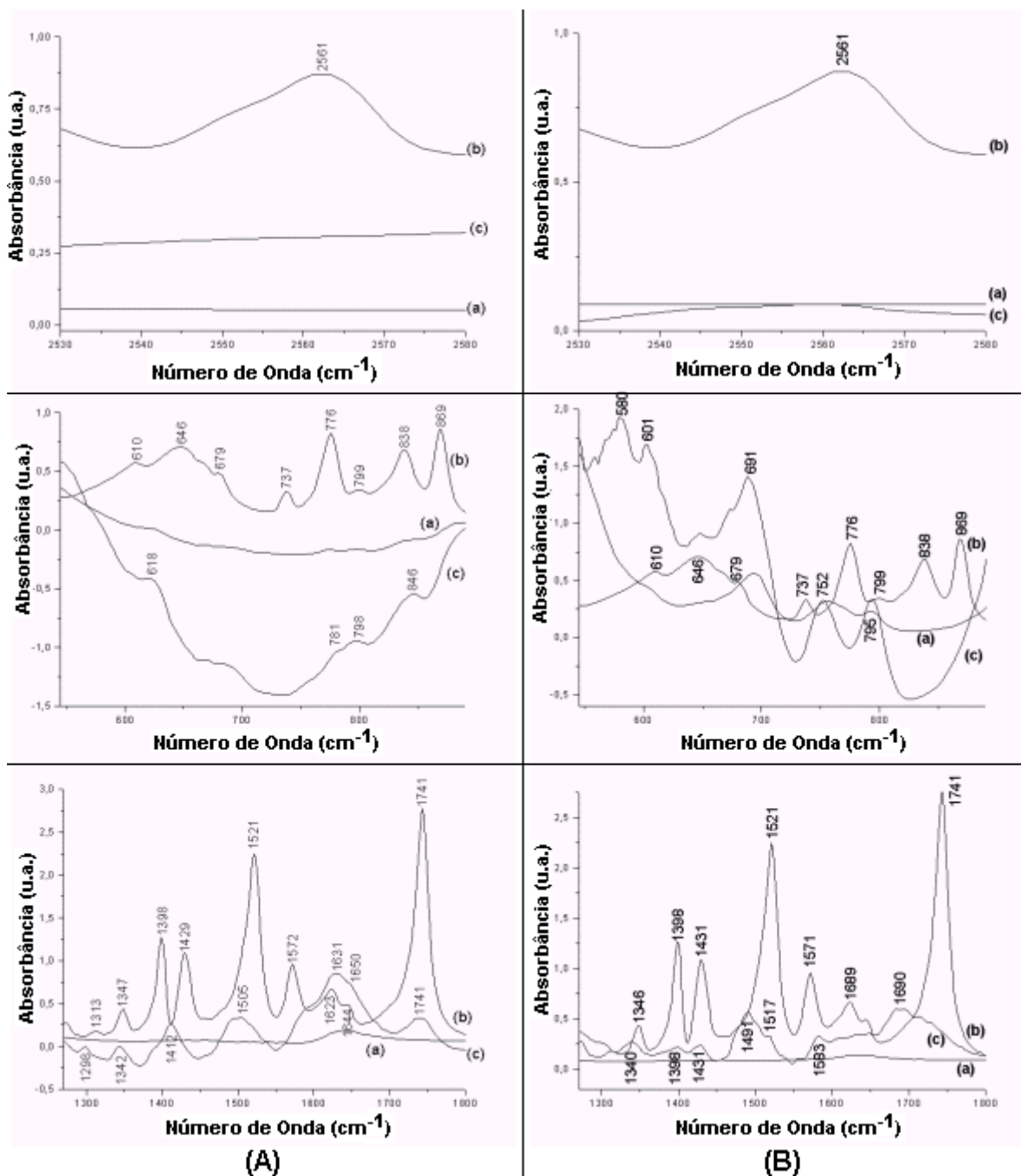


Figura 12 – Espectro FT-IR de: **(A)** bentonita (a), cisteína sólida (b) e cisteína adsorvida em bentonita (c); **(B)** caulinita (a), cisteína sólida (b) e cisteína adsorvida em caulinita (c). As amostras com argila foram agitadas por 24 h com água do mar e solução saturada de cisteína em água do mar. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 r.p.m., e o sólido seco em estufa a 40°C por 24 h.

bentonita mostra que as bandas em 1429 e 1572 cm^{-1} desapareceram, bandas em 1347 e 1741 cm^{-1} diminuíram de intensidade, àquelas em 838, 1398, 1623 e 1644 cm^{-1} deslocaram para 846, 1412, 1631 e 1650 cm^{-1} e a banda em 1521 cm^{-1} diminuiu de intensidade e se deslocou para 1505 cm^{-1} . As bandas devido ao estiramento de S-H e C-S não foram observadas no espectro da Cys adsorvida em bentonita devido a forte interação bentonita/enxofre (figura 12-A-c). Para as amostras adsorvidas em caulim, o espectro mostra que a banda em 2561 cm^{-1} diminuiu de intensidade, e que a banda em 679 cm^{-1} não foi observada devido a uma forte banda do caulim em 691 cm^{-1} (figura 12-B-c). É muito provável que a interação caulim/enxofre seja tão forte como bentonita/enxofre. Também foi observado que as bandas em 776, 838, 869, 1431 e 1571 cm^{-1} desapareceram; as bandas em 1346, 1398 e 1741 cm^{-1} diminuíram de intensidade; a banda em 1521 cm^{-1} diminuiu de intensidade e dividiu-se em duas bandas em 1491 e 1517 cm^{-1} (figura 12-B-c). Assim, a interação Cys/argilas ocorre através dos grupos sulfidríla e amino, o que demonstra sua complexidade.

O mecanismo de formação de ligações peptídicas sobre argilas utilizando ciclos de hidratação/desidratação propõe que os aminoácidos interagem com a argila através do grupo carbonila (White *et al.*, 1984; Bujdák e Rode, 2001). No entanto, os resultados por nós obtidos mostram que todos os aminoácidos aqui estudados interagem com argilas pelo grupo amina e no caso da cisteína esta interação ocorre também pelo grupo sulfidríla.

4.1.3 Difractometria de raios-X das amostras aminoácidos/argilas

O espectro da Cys adsorvida em bentonita mostrou as maiores variações entre os aminoácidos aqui estudados. Assim, um estudo utilizando a técnica de difratometria de raios-X foi realizado na tentativa de melhor entender este processo de adsorção.

Os dados de difratometria de raio-X (figuras 13 e 14) mostram que o pH afeta as camadas internas da bentonita. A expansão intercamada ocorreu em pH 3,00, 6,00 e 8,00 (figura 13) e foi de 14,1; 14,9 e 13,9 Å,

respectivamente. Para as amostras de Cys adsorvida em bentonita, a expansão das camadas internas foi maior devido a inclusão de Cys. A expansão foi maior em pH 3,00 (18,3 Å) e 8,00 (17,3 Å), e uma menor expansão (15,2 Å) foi observada em pH 6,00. A expansão em pH 3,00 da Cys/bentonita foi maior do que a de amostras de etileno glicol/bentonita saturada com Mg (17,7 Å) (figura 14). Os resultados de difratometria de raios-X mostram que o aminoácido foi incluído na intercamada o que demonstra a elevada afinidade da Cys pelas camadas internas da bentonita (Borchardt, 1989; Moore e Reynolds, 1989).

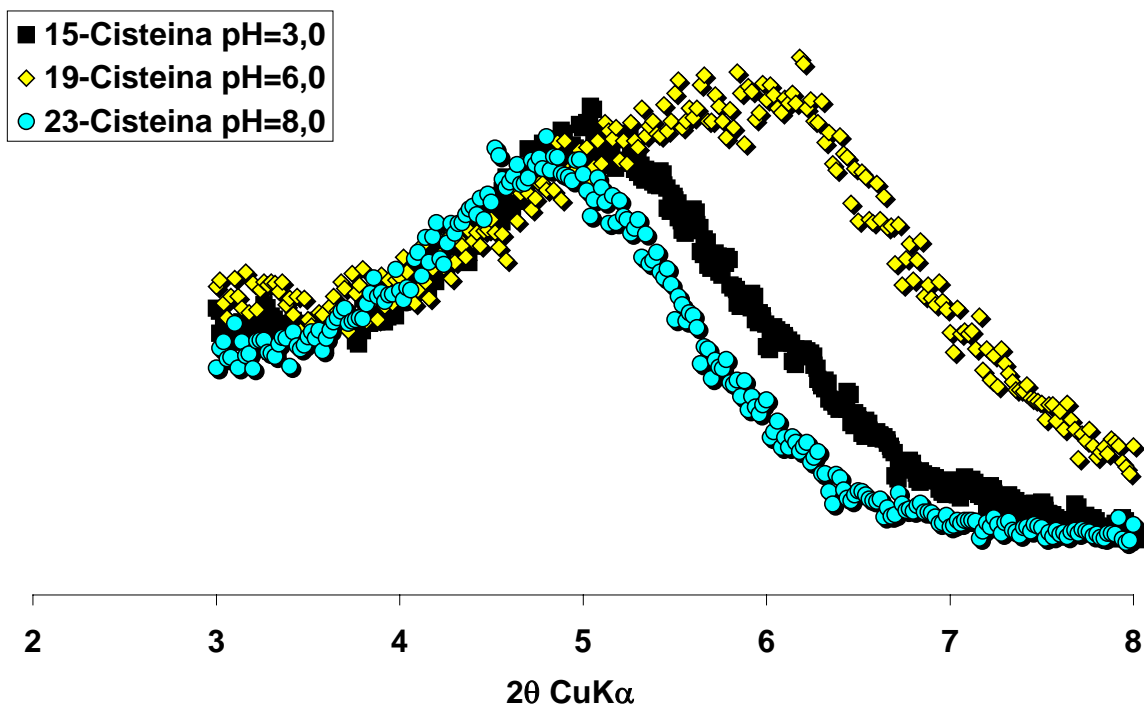
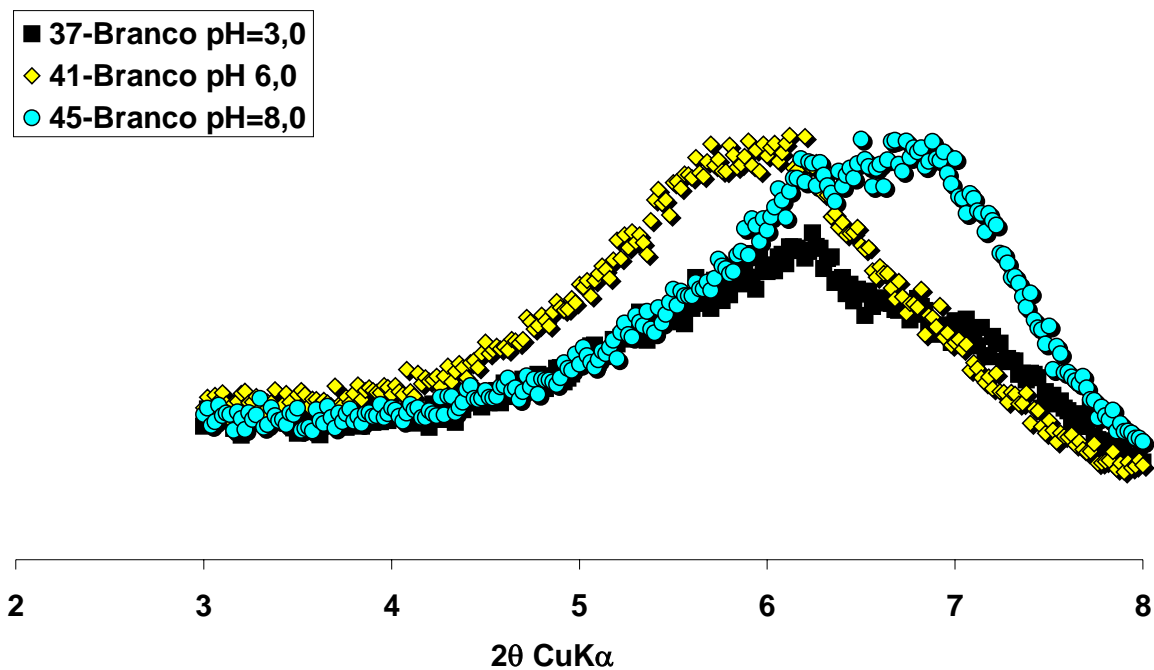


Figura 13 – Difractogramas de raios-X das amostras de bentonita em equilíbrio com soluções contendo NaOH 0,1M em três valores de pH sem (acima) e com cisteína (abaixo).

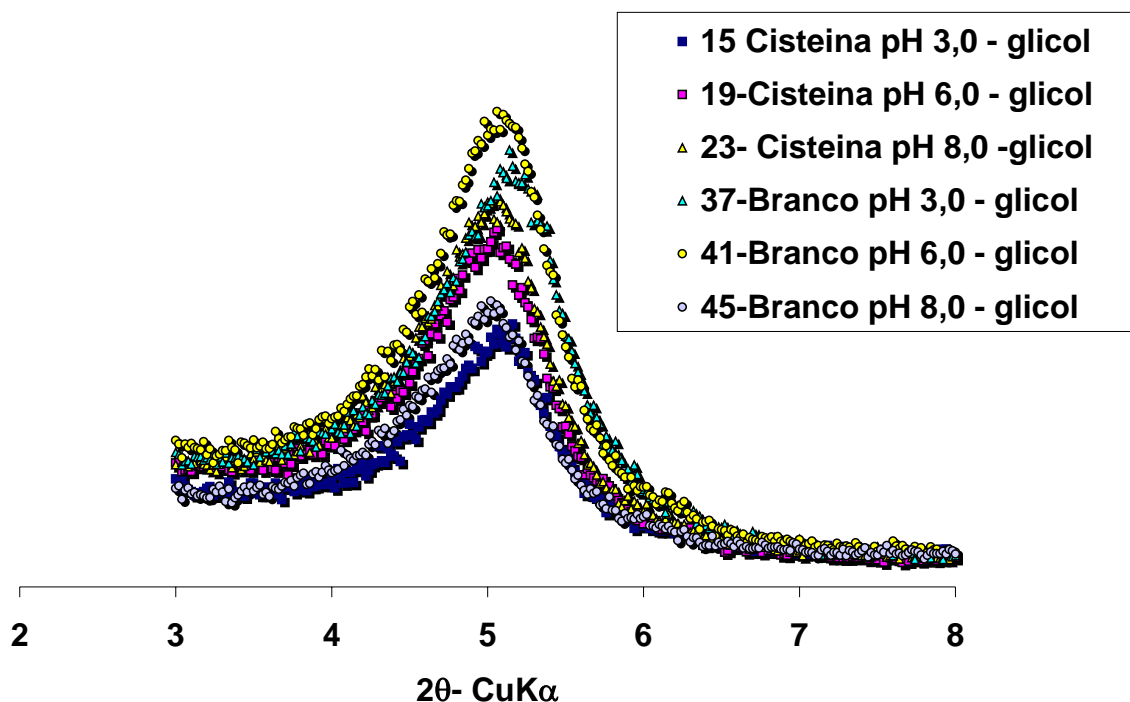


Figura 14 – Difratoogramas de raios-X das amostras de bentonita na presença ou ausência de cisteína em três valores de pH.

4.1.4 Espectroscopia Mössbauer das amostras aminoácidos/argilas

Análises químicas revelaram que a bentonita é composta por 2,7% de Fe_2O_3 e como apontado por alguns autores (Hartman, 1975; Wächtershäuser, 1988; Kaschke *et al.*, 1994), a interação de compostos enxofre/ferro tem um importante papel na química prebiótica. Este fato motivou um estudo utilizando

a espectroscopia Mössbauer na tentativa de melhor compreender a possível interação ferro/Cys. A figura 15 mostra o espectro RT Mössbauer para a bentonita. O espectro foi ajustado com dois dubletos, o maior componente correspondendo ao íon férrico e o menor ao íon ferroso. Este resultado é consistente com resultados divulgados anteriormente, onde, ambas as valências do ferro (Fe^{3+} e Fe^{2+}) foram detectadas (Oliveira *et al.*, 2003). O espectro Mössbauer para as amostras de Cys é mostrado na figura 16. Novamente, dois dubletos podem ser observados compreendendo o

espectro inteiro, embora com um grande aumento (~20%) devido à contribuição do íon ferroso. Isto quer dizer que a Cys foi capaz de reduzir parcialmente o ferro presente na bentonita. Cowan 1993, através de espectrometria Mössbauer, mostra a reação de oxiredução que ocorre com a aconitase, onde, os íons ferro são reduzidos a Fe 2,5. O espectro inserido no canto da figura 16 mostra o espectro RT Cys/Fe³⁺. Os parâmetros hiperfinos e áreas subespectrais obtidas destes ajustes são apresentados na tabela 6.

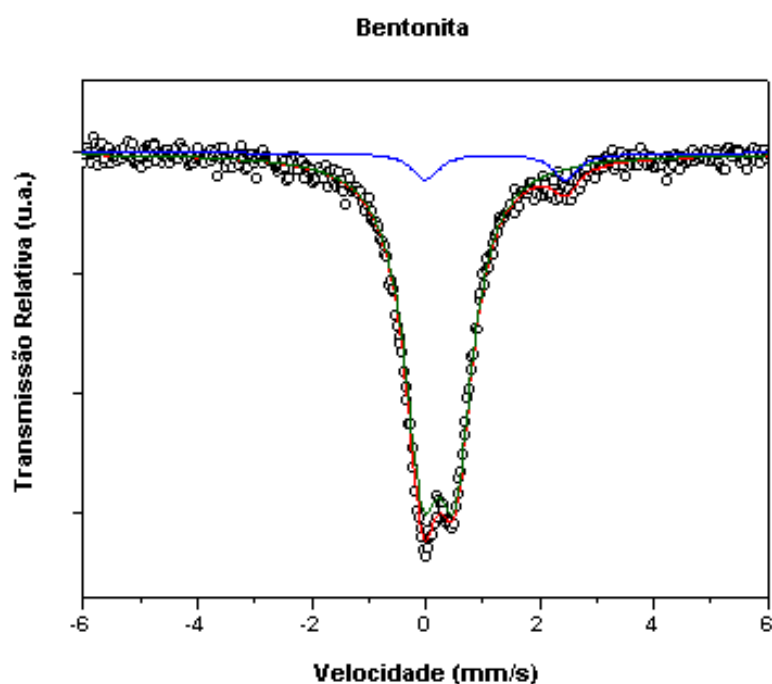


Figura 15 – Espectro Mössbauer RT para a bentonita.

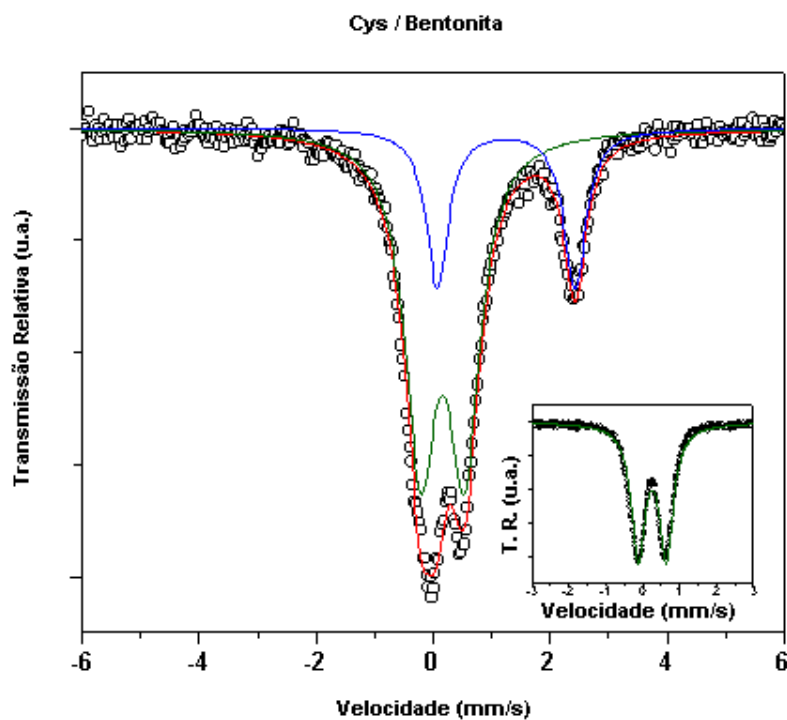


Figura 16 – Espectro Mössbauer RT para a Cys adsorvida em bentonita. A figura interna mostra o espectro de Cys/Fe³⁺.

Tabela 6 – Parâmetros hiperfinos e áreas subspectrais Mössbauer para as amostras de bentonita com e sem cisteína adsorvida.

Amostra	Temperatura	Subspectro	IS ^a (mm/s) (±0.02)	QS (mm/s) (±0.02)	Γ (mm/s) (±0.2)	Área (%) (±0.3)
Sem Cys	300 K	Dubleto (Fe ³⁺)	0.23	0.58		93.3
		Dubleto (Fe ²⁺)	1.22	2.45		6.7
Com Cys	300 K	Dubleto (Fe ³⁺)	0.27	0.75	0.64	73.0
		Dubleto (Fe ²⁺)	1.36	2.35	0.45	27.0

^a Relativo ao α-Fe metálico a temperatura ambiente.

4.2 ADSORÇÃO DE BASES NITROGENADAS SOBRE ARGILAS

4.2.1 Adsorção

As tabelas 7 e 8 mostram os parâmetros de Langmuir e Freundlich calculados a partir das curvas de adsorção para diversas bases nitrogenadas (**A**, adenina; **C**, citosina; **T**, timina e **U**, uracila) sobre argilas (bentonita, montmorilonita e caulim) em duas faixas de pH (2,00 e 7,20). A faixa de pH 7,20 foi escolhida visto que é este o valor médio do pH dos oceanos. O pH 2,00 foi escolhido, pois o mesmo ocorre em alguns hidrotermais e também, neste pH estaríamos fora das faixas de pK_a das bases nitrogenadas encontrados em pH 7,20 (tabela 2).

As capacidades máximas de adsorção (**b**) obtidas utilizando a equação de Langmuir mostram os maiores valores para as bases: **A** adsorvida sobre bentonita e montmorilonita na faixa de pH 2,00, e **C** adsorvida sobre montmorilonita na faixa de pH 2,00 sendo que estes valores não são estatisticamente diferentes um do outro (S.N.K.>0,05), porém são estatisticamente diferentes (S.N.K.<0,05) de todos os outros resultados mostrados na tabela 7. Perezgasga *et al.*, (2005) estudaram a adsorção de bases nitrogenadas sobre montmorilonita e também observaram uma maior adsorção da **A** do que de **U**. Para o caso do caulim foi possível somente calcular **b** para **A** em pH 2,00, visto que, em pH 7,20 não ocorreu adsorção (tabela 7). Para todas as outras bases, nos dois pHs estudados, não ocorreu adsorção sobre esta argila (dado não mostrado). Não foi possível obter um ajuste da curva de Langmuir para calcular o parâmetro **b** para as seguintes

Tabela 7 – Parâmetros de Langmuir das bases do DNA/RNA adsorvidos sobre argilas

Base	Argila	*Faixa de pH	**b (µg/mg)	***K (mL/µg)	#r
adenina	bentonita	2,21-2,41	29,5±1,9 (5) [5] ^C	0,0238±0,0043 (5) [5] ^B	0,9924±0,0020 (5) [5]
		6,80-7,80	11,0±3,3 (8) [10] ^{B,D,F,I}	0,0110±0,0033 (5) [10] ^B	0,8790±0,0384 (8) [10]
	montmorilonita	2,17-2,58	33,9±0,4 (4) [5] ^A	0,0490±0,0027 (4) [5] ^A	0,9869±0,0011 (4) [5]
		6,13-7,90	(0) [13]	(0) [13]	(0) [13]
	caulim	1,93-2,90	0,175±0,086 (4) [13] ^{B,D,F,H,J}	(0) [13]	0,5965±0,1286 (4) [13]
		7,17-8,00	NA	NA	NA
citosina	bentonita	2,20-2,60	16,1±0,9 (4) [6] ^{B,D,F,G}	0,0267±0,0071 (3) [6] ^B	0,9955±0,0010 (4) [6]
		6,60-7,55	8,45±4,30 (4) [10] ^{B,D,F}	0,0118±0,0061 (4) [10] ^B	0,4698±0,0851 (4) [10]
	montmorilonita	2,14-2,36	27,8±1,8 (5) [5] ^E	0,0184±0,0036 (5) [5] ^B	0,9903±0,0044 (5) [5]
		6,75-7,90	8,89±3,46 (6) [10] ^{B,D,F}	0,0084±0,0026 (5) [10] ^B	0,5516±0,0622(6) [10]
uracila	bentonita	1,99-2,28	0,047±0,015 (5) [5] ^{BD,F,H,J}	(0) [5]	0,9280±0,0240 (5) [5]
		6,90-7,30	0,176±0,059 (4) [6] ^{B,D,F,H',J}	0,0181 (1) [6]	0,8843±0,0374 (4) [6]
	montmorilonita	1,92-2,06	(0) [5]	(0) [5]	(0) [5]
		6,98-7,54	(0) [5]	(0) [5]	(0) [5]
timina	bentonita	1,85-2,35	(0) [6]	(0) [6]	(0) [6]
		6,55-7,37	(0) [5]	(0) [5]	(0) [5]
	montmorilonita	1,94-2,31	(0) [5]	(0) [5]	(0) [5]
		6,84-7,54	(0) [5]	(0) [5]	(0) [5]

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. O número de experimentos em duplicatas que ajustaram na curva de Langmuir é dado entre parênteses. O número de experimentos é dado entre colchetes com duas séries cada experimento. NA=não adsorveu. *Faixas de pH após as amostras serem agitadas por 3 h para a bentonita e a montmorilonita e 16 h para o caulim. Os pHs foram ajustados em tempo t=0 em 2,00 ou 7,20. **b=capacidade máxima de adsorção. ***K=energia de ligação base/argila. #Coeficiente de correlação da reta. Para b, teste ANOVA (F=21,35, P=0,000), valores do teste SNK estatisticamente diferentes (p<0,05) um do outro: A/B, C/D, E/F, G/H e I/J; Para K, teste ANOVA (F=10,84, P=0,000), valores do teste SNK estatisticamente diferentes (p<0,05) um do outro: A/B.

Tabela 8 – Parâmetros de Freundlich das bases do DNA/RNA adsorvidos sobre argilas

Base	Argila	*Faixa de pH	**n	***K _f	#r
adenina	bentonita	2,21-2,41	3,76±0,38 (5) [5]	5,67±0,59 (5) [5] ^{B,E}	0,9830±0,0039 (5) [5]
		6,80-7,80	1,71±0,56 (8) [10]	0,586±0,291 (8) [10] ^{B,D,F,H}	0,8747±0,0437 (8) [10]
	montmorilonita	2,17-2,58	5,68±0,63 (5) [5]	11,4±0,2 (5) [5] ^A	0,9194±0,0230 (5) [5]
		6,13-7,90	0,499± 0,045 (9) [13]	0,0018± 0,0012(9) [13] ^{B,D,F,H}	0,8504± 0,0524(9) [13]
	caulim	1,93-2,90	0,089±0,012 (7) [13]	< 10 ⁻¹⁰ (7) [13]	0,8407±0,0780 (7) [13]
		7,17-8,00	NA	NA	NA
citosina	bentonita	2,20-2,60	12,4±5,8 (6) [6]	5,91±1,59 (6) [6] ^{B,C}	0,9104±0,0508 (6) [6]
		6,60-7,55	0,737±0,155 (7) [10]	0,0140±0,0092 (7) [10] ^{B,D,F,H}	0,7908±0,0544 (7) [10]
	montmorilonita	2,14-2,36	2,96±0,32 (5) [5]	3,52±0,54 (5) [5] ^{B,D,F,G}	0,9864±0,0073 (5) [5]
		6,75-7,90	1,15±0,20 (10) [10]	0,108±0,049 (10) [10] ^{B,D,F,H}	0,7515±0,0540 (10) [10]
uracila	bentonita	1,99-2,28	0,423±0,173 (3) [5]	0,0013± 0,0012(3) [5] ^{B,D,F,H}	0,8542±0,0958 (3) [5]
		6,90-7,30	1,99±1,63 (3) [6]	0,0319±0,0319 (3) [6] ^{B,D,F,H}	0,7524±0,2074 (3) [6]
	montmorilonita	1,92-2,06	0,257± 0,024 (5) [5]	<10 ⁻⁸ (5) [5]	0,9791± 0,0024 (5) [5]
		6,98-7,54	0,445± 0,053 (5) [5]	<10 ⁻⁴ (5) [5]	0,9793± 0,0076 (5) [5]
timina	bentonita	1,85-2,35	0,339± 0,043 (5) [6]	<10 ⁻⁶ (5) [6]	0,9495±0,0161 (5) [6]
		6,55-7,37	0,299± 0,047 (5) [5]	<10 ⁻⁶ (5) [5]	0,9778± 0,0069 (5) [5]
	montmorilonita	1,94-2,31	0,524± 0,007 (5) [5]	<10 ⁻⁵ (5) [5]	0,9859± 0,0078 (5) [5]
		6,84-7,54	0,456± 0,062 (5) [5]	<10 ⁻⁴ (5) [5]	0,9469± 0,0297 (5) [5]

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. O número de experimentos em duplicatas que ajustaram na curva de Freundlich é dado entre parênteses. O número de experimentos é dado entre colchetes com duas séries cada experimento. NA=não adsorveu. *Faixas de pH após as amostras serem agitadas por 3 h para a bentonita e a montmorilonita e 16 h para o caulim. Os pHs foram ajustados em tempo t=0 em 2,00 ou 7,20. **n=reatividade dos sítios de adsorção. ***K_f=capacidade de adsorção. #Coeficiente de correlação da reta., Para K_f, teste ANOVA (F=44,61, P=0,000), valores do teste SNK estatisticamente diferentes (p<0,05) um do outro: A/B, C/D, E/F e G/H.

bases: **A** adsorvida sobre montmorilonita na faixa de pH 7,00, **U** adsorvida sobre montmorilonita nas faixas de pH 2,00 e 7,00 e **T** adsorvida sobre todas argilas e em todos os pHs, visto que estes valores são negativos o que poderia significar que os sais da água do mar estão ocupando os sítios de adsorção e impedindo a entrada das bases.

Um aumento do pH provocou uma diminuição dos valores de **b** para as seguintes bases: **A** adsorvida sobre bentonita, caulim e montmorilonita e **C** adsorvida sobre montmorilonita (S.N.K.<0,05) (tabela 7). Para os outros casos não ocorreu variação do parâmetro **b** com o pH (S.N.K.>0,05) (tabela 7). Perezgasga *et al.* (2005) estudaram a adsorção de **A** sobre montmorilonita em diversas faixas de pH (2,00; 6,00 e 10,00) e também observaram uma maior adsorção em pH 2,00. Esta maior adsorção de algumas bases sobre as argilas em função do pH pode ser explicada considerando as cargas das argilas e das bases em cada pH. No pH 2,00 tanto **A** quanto a **C** (ver valores de pK_a ; tabela 2) estão positivamente carregadas e as argilas bentonita e montmorilonita estão negativamente carregadas (ver p_{oz} ; tabela 3). Esta diferença de carga ocasiona um aumento da adsorção. Na faixa de pH 7,00 ocorre um aumento de cargas negativas tanto nas argilas como nas bases, ocasionado uma diminuição na adsorção (tabelas 7 e 8). Para o caso da **U** não observamos variação da adsorção (S.N.K.>0,05) com o pH visto que na faixa estudada a **U** está sempre neutra e as argilas estão sempre carregadas negativamente (tabelas 7 e 8).

A tabela 7 também mostra a energia de ligação (**K**) obtida a partir do ajuste da isoterma de Langmuir, neste caso observamos que a maior interação ocorreu entre **A**/montmorilonita em pH 2,00 sendo que este valor foi estatisticamente diferente de todos os outros (S.N.K.<0,05) (tabela 7). Os resultados da tabela 7 também mostram que nos casos onde ocorreu uma grande adsorção (**b**), o valor de **K** foi maior, sendo estes: **A** e **C** adsorvidas sobre bentonita e montmorilonita na faixa de pH 2,00.

Para todos os casos mostrados na tabela 7 o fator de correlação da reta (**r**) obtida na faixa de pH 2,00 foi sempre melhor do que aquele obtido na faixa de pH 7,20. A explicação para o melhor ajuste na faixa de pH 2,00 pode ser que nesta faixa ocorreu uma maior adsorção, portanto um

menor erro foi cometido nas medidas, mas também pode ser que o mecanismo de adsorção na faixa de pH 7,20 seja diferente daquele da faixa de pH 2,00.

A afinidade dos sítios de adsorção (n) obtidos utilizando a equação de Freundlich mostra que em geral quando este valor é maior do que um, temos um valor de capacidade de adsorção (K_f) alto (tabela 8). O maior valor de K_f foi obtido para **A** adsorvida sobre montmorilonita na faixa de pH 2,00 (S.N.K.<0,05) (tabela 8), sendo que esta mesma base, adsorvida sobre montmorilonita na faixa de pH 2,00 apresentou também o maior valor de **b** (tabela 7). Outras bases também apresentaram valores altos de K_f sendo estas: **A** adsorvida sobre bentonita na faixa de pH 2,00 e **C** adsorvida sobre bentonita e montmorilonita na faixa de pH 2,00 (tabela 8). Devemos salientar que estas mesmas bases adsorvidas sobre as mesmas argilas na faixa de pH 2,00 também apresentaram os maiores valores de **b** (tabela 7). Os valores de K_f para as bases **A** (caulim, pH 2,00), **U** (montmorilonita pHs 2,00 e 7,20) e **T** (todas as argilas e pHs) foram muito pequenos indicando sua baixa adsorção (tabela 8).

Em geral os valores de n diminuíram com o aumento do pH indicando uma alteração na reatividade dos sítios de adsorção com o pH (tabela 8).

No caso das bases **A** e **C** adsorvidas sobre bentonita e montmorilonita um aumento do pH resultou numa diminuição dos valores de K_f (S.N.K.<0,05) (tabela 8). No caso da **U** adsorvida sobre bentonita não foi observado alteração de K_f com o pH (S.N.K.>0,05) (tabela 8). Para as outras bases os valores de K_f obtidos são muito pequenos ($< 10^{-4}$), não sendo relevante uma análise estatística (tabela 8).

Para todos os casos, exceto **T** adsorvida sobre bentonita, o fator de correlação da reta (r) obtida na faixa de pH 2,00 foi sempre melhor do que aquele obtido na faixa de pH 7,20 (tabela 8). No entanto, devemos salientar que os valores de r obtidos para isotermas de Freundlich (tabela 8) são melhores que os obtidos para as isotermas de Langmuir (tabela 7) nos pHs estudados. Portanto, podemos dizer que o melhor ajuste das isotermas ao modelo de Freundlich pode estar associado ao fato que os sítios de adsorção são heterogêneos.

A tabela 9 mostra os resultados obtidos para a soma da quantidade de base adsorvida dividida pela quantidade de argila (K_{ad}). A maior adsorção foi da **A** sobre a montmorilonita na faixa de pH 2,00 (S.N.K.<0,05). A quantidade K_{ad} das bases nitrogenadas adsorvidas sobre as argilas nas duas faixas de pH estudadas mostrou a seguinte ordem preferencial de adsorção: **A>C>T>U** (tabela 9). Um fato que devemos destacar é que os valores de K_{ad} , **b** e K_f mostram uma concordância entre eles, ou seja, quando **b** tem um valor alto para uma determinada base o mesmo ocorre com K_{ad} e K_f (tabelas 7, 8, 9). Sowerby *et. al.* (2001a) estudaram a adsorção de diversas bases nitrogenadas

Tabela 9 – Quantidade de bases de DNA/RNA adsorvidos sobre argilas

Base	Argilas	*Faixa de pH	** K_{ad} ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
adenina	bentonita	2,21-2,41	$19,5 \pm 0,3$ [5] ^{B,C}	
		6,80-7,80	$6,06 \pm 0,26$ [10] ^{B,D,F,H,J,K}	
	montmorilonita	2,17-2,58	$21,7 \pm 0,8$ [5] ^A	
		6,13-7,90	$7,44 \pm 0,25$ [13] ^{B,D,F,H,I}	
	caulim	1,93-2,90	$0,407 \pm 0,039$ [13] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,S,U}	
		7,17-8,00	NA	
citosina	bentonita	2,20-2,60	$13,1 \pm 0,3$ [6] ^{B,D,F,G}	
		6,60-7,55	$2,15 \pm 0,16$ [10] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,R}	
	montmorilonita	2,14-2,36	$17,7 \pm 0,1$ [5] ^{B,D,E}	
uracila	bentonita	1,99-2,28	$0,212 \pm 0,022$ [5] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,S,U}	
		6,90-7,30	$0,287 \pm 0,018$ [6] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,S,U}	
	montmorilonita	1,92-2,06	$1,24 \pm 0,14$ [5] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,S}	
		6,98-7,54	$1,35 \pm 0,06$ [5] ^{B,D,F,H,J,L,N,P}	
	timina	bentonita	1,85-2,35	$0,776 \pm 0,049$ [6] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,S}
			6,55-7,37	$0,700 \pm 0,018$ [5] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,S}
montmorilonita		1,94-2,31	$4,23 \pm 0,08$ [5] ^{B,D,F,H,J,L,M}	
		6,84-7,54	$1,59 \pm 0,04$ [5] ^{B,D,F,H,J,L,N,P,T}	

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. O número de experimentos é dado entre os colchetes com duas séries cada experimento. NA=não adsorveu. *Faixas de pH após as amostras serem agitadas por 3 h para a bentonita e a montmorilonita e 16 h para o caulim, os pHs foram ajustados em t=0 em 2,00 ou 7,20. **Para cada curva, foi obtido K_{ad} : $K_{ad} = [\text{quantidade total de base adsorvida em argila} / \text{quantidade total de argila}]$, Para K_{ad} , teste ANOVA (F=751,63, P=0,000), valores teste SNK estatisticamente diferentes (p<0,05) do outro: A/B, C/D, E/F, G/H, I/J, K/L, M/N, O/P, R/S e T/U.

dissolvidas em água sobre grafite e obtiveram a seguinte ordem de deslocamento: **G>A>H>T>C>U**. No entanto devemos destacar dois pontos: a) o grafite é um material muito diferente das argilas aqui estudadas e b) utilizamos água do mar ao invés de somente água destilada.

Um aumento do pH resultou numa diminuição de K_{ad} para as seguintes bases: **A** e **C** adsorvidas sobre todas as argilas e **T** adsorvida sobre montmorilonita (S.N.K.<0,05) (tabela 9). Não foi observado nenhuma variação de K_{ad} com o pH para **U** adsorvida sobre todas as argilas e **T** adsorvida sobre bentonita (tabela 9). O caulim adsorveu somente a **A** na faixa de pH 2,00, para todas as outras bases nos dois pHs estudados não ocorreu adsorção sobre esta argila (dado não mostrado).

Os resultados das tabelas 7, 8 e 9 mostram que as bases **A** e **C** adsorvem consideravelmente sobre as argilas bentonita e montmorilonita na faixa de pH 2,00, porém, as bases **U** e **T** apresentaram baixa adsorção nas argilas e faixas de pHs estudadas. Estes resultados sugerem duas questões, ou melhor, apontam para dois problemas: a) o pH onde ocorreu a maior adsorção é muito baixo apesar de ocorrer em alguns hidrotermais, porém seriam eles muito comuns? e b) o outro problema é ainda pior, a ocorrência das bases nos seres vivos não tem a mesma relação encontrada neste experimento.

Uma análise das bases encontradas no DNA de diversos seres vivos mostra a seguinte relação **A/T** dependendo da espécie: 1,05 para homo sapiens; 1,03 para carneiro; 1,02 para galinha; 1,05 para tartaruga; 1,02 salmão; 1,02 ouriço do mar; 1,00 gafanhoto; 1,01 germe de trigo; 0,95 levedura; 1,04 E. Coli (Lehninger, 1984). Portanto seres vivos muito diferentes possuem quase as mesmas quantidades de **A** e **T**. Entretanto se verificarmos os resultados mostrados nas tabelas 7, 8, e 9 observamos que em qualquer situação a **A** é muito mais adsorvida que a **T**, ou seja, a relação **A/T** é muito maior do que um. Estes resultados levantam algumas questões sobre o papel dos minerais em fornecer um mecanismo para concentração de bases: deveríamos esperar que a composição das bases nitrogenadas adsorvidas sobre minerais refletisse as dos DNA atuais? A adsorção de bases nitrogenadas sobre minerais foi importante para a origem da vida?

4.2.2 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR) das amostras bases nitrogenadas / argilas

Análises por espectroscopia FT-IR foram realizadas para melhor entender a interação entre argilas (bentonita e montmorilonita) e as bases nitrogenadas (**A**, **C**, **T**, **U**). Para todas as bases adsorvidas em argilas, os espectros FT-IR foram melhores em pH 2,00 (dados não mostrados). As figuras 17 e 18 mostram os espectros FT-IR resultantes para a bentonita e montmorilonita, bases sólidas puras e bases adsorvidas em bentonita e montmorilonita, respectivamente.

Os espectros FT-IR da **A** sólida (figura 17-A-b e 18-A-b) mostram bandas em 1603 e 1672 cm^{-1} as quais podem ser atribuídas ao estiramento C=N e deformação NH_2 , respectivamente (Colthup *et al.*, 1964). Os espectros da **A** adsorvida sobre bentonita (figura 17-B-b) e montmorilonita (figura 18-B-b) mostram deslocamentos nas frequências de 1603 para 1626, de 1672 para 1699 cm^{-1} , de 1603 para 1631 e de 1626 para 1700 cm^{-1} , respectivamente.

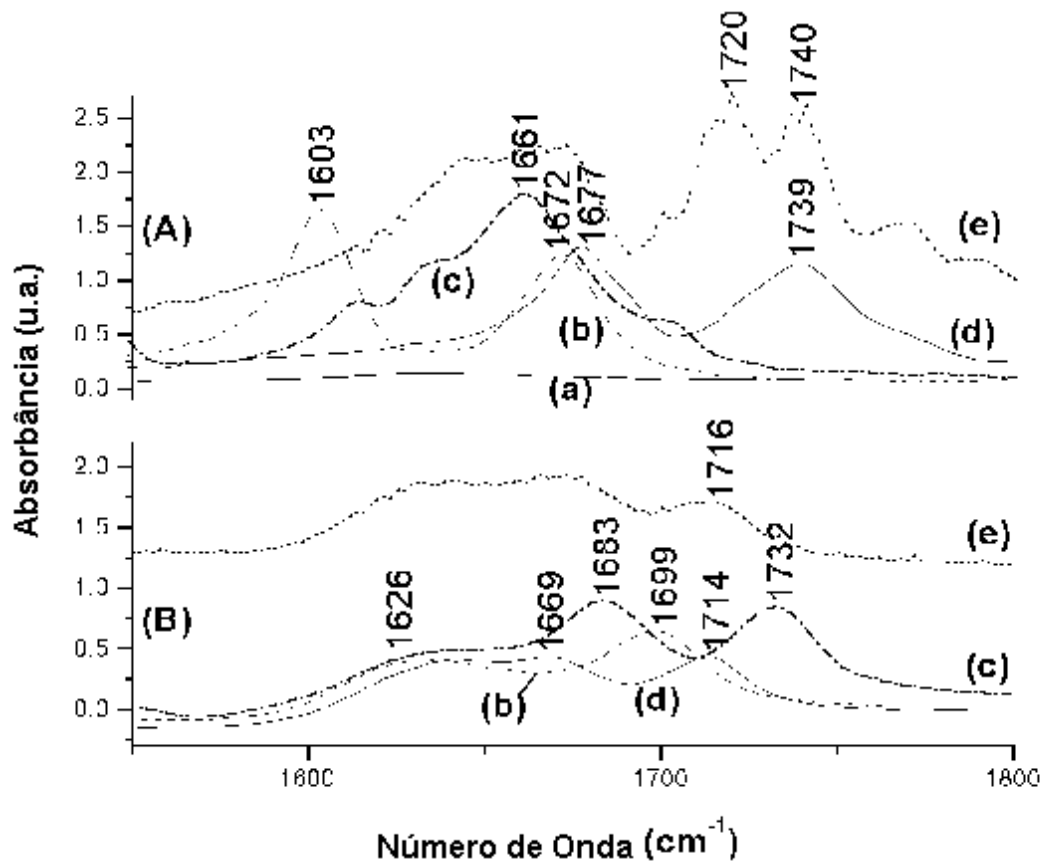


Figura 17 – Espectros FT-IR da **(A)**: bentonita (a), adenina sólida (b), citosina sólida (c), timina sólida (d) e uracila sólida (e); **(B)**: adenina (b), citosina (c), timina (d) e uracila (e) adsorvidas sobre bentonita. As amostras com argilas foram agitadas por 3 h com solução saturada de base (adenina, citosina, timina ou uracila) dissolvidas em água do mar. A solução foi filtrada e, então, os sólidos foram secados em estufa a 40°C por 24 h.

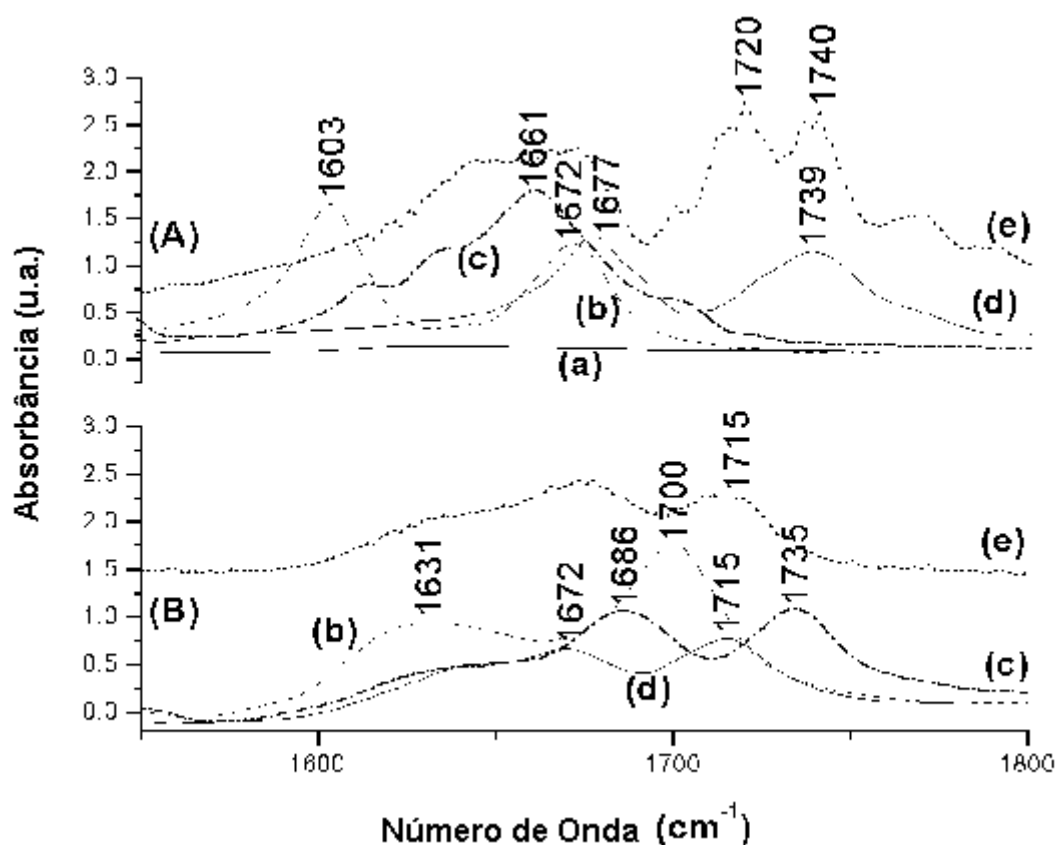


Figura 18 – Espectros FT-IR da **(A)**: montmorilonita (a), adenina sólida (b), citosina sólida (c), timina sólida (d) e uracila sólida (e); **(B)**: adenina (b), citosina (c), timina (d) e uracila (e) adsorvidas sobre montmorilonita. As amostras com argilas foram agitadas por 3 h com solução saturada de base (adenina, citosina, timina ou uracila) dissolvidas em água do mar. A solução foi filtrada e, então, os sólidos foram secados em estufa a 40°C por 24 h.

Considerando que neste pH as argilas estão negativamente carregadas pode-se afirmar que a interação da **A** com as argilas foi através do grupo NH_2^+ protonado, propiciando o enfraquecimento da ligação C=N sobre as argilas.

Os espectros da **C** sólida (figura 17-A-c e 18-A-c) mostram a banda em 1661 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento C=O (Yamada *et al.*, 2004). Os espectros da **C** adsorvida em bentonita (figura 17-B-c) e montmorilonita (figura 18-B-c) mostram uma divisão da frequência em 1661 para 1683 e 1732 cm^{-1} e para 1686 e 1735 cm^{-1} , respectivamente. É possível que a interação da **C** com as argilas foi também através do grupo NH_2^+

protonado, mostrando uma nova banda a 1732-1735 cm^{-1} e um deslocamento na frequência $\nu(\text{C}=\text{O})$ para 1683-1686 cm^{-1} .

Os espectros FT-IR da **T** sólida (figura 17-A-d e 18-A-d) mostram bandas em 1677 e 1739 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao estiramento C=C e C=O (Aroca e Bujalski, 1999). Os espectros da **T** adsorvida sobre bentonita (figura 17-B-d) e montmorilonita (figura 18-B-d) mostram um deslocamento de frequências de 1677 e 1739 cm^{-1} para 1669 e 1714 cm^{-1} e para 1672 e 1715 cm^{-1} , respectivamente. Possivelmente a interação da **T** com as argilas foi através do grupo NH presente no anel base (posição 3), propiciando o enfraquecimento das ligações C=C e C=O nas argilas.

Os espectros da **U** sólida (figura 17-A-e e 18-A-e) mostram bandas em 1720 e 1740 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao estiramento C=C e C=O (Lewandowski *et al.*, 2005). Os espectros da **U** adsorvida sobre bentonita (figura 17-B-e) e montmorilonita (figura 18-B-e) mostram um deslocamento na frequência 1720 cm^{-1} para 1716 e 1715 cm^{-1} , respectivamente, e um desaparecimento da banda em 1740 cm^{-1} . Possivelmente, a interação da **U** com as argilas foi através do grupo NH presente no anel da base (posição 3), propiciando o enfraquecimento da ligação C=C e C=O sobre as argilas.

5 CONCLUSÕES

Adsorção de aminoácidos sobre argilas

A concentração de Ala, Cys e Asp adsorvidos sobre caulim, tão bem quanto Cys e Asp adsorvidos sobre bentonita não se alterou nas faixas de pH aqui estudadas. Em geral, os aminoácidos com grupo R carregado (Asp, Lys e His) e Cys (grupo R não-carregado polar) foram mais adsorvidos sobre caulim e bentonita do que os outros aminoácidos (Ala, Met e Gln). Estes resultados sugerem algumas questões sobre o papel dos minerais em fornecer um mecanismo de pré-concentração de aminoácidos: qual foi o mecanismo envolvido na produção de peptídeos/proteínas com mais aminoácidos contendo grupo R não-carregado do que grupo R carregado e Cys? Poderíamos esperar que a composição dos aminoácidos adsorvidos sobre minerais refletisse a das proteínas atuais? A adsorção de aminoácidos sobre minerais foi importante para a origem da vida?

Os espectros de FT-IR mostraram que a adsorção de Ala, Met, Gln, Asp, Lys e His em argilas (bentonita e caulinita) ocorreu através do grupo amino, provavelmente como NH_3^+ . Entretanto, a interação Cys/argilas ocorreu através do grupo sulfidril, demonstrando a complexidade da interação envolvida.

Os dados de difratometria de raios-X mostraram que o pH afeta a camada interna da bentonita e que a expansão da Cys/bentonita em pH 3,00 foi maior do que a expansão do etileno glicol/bentonita saturado com Mg. Estes resultados demonstram a elevada afinidade da Cys pela camada interna da bentonita.

O espectro Mossbauer para as amostras com Cys adsorvida apresentou um grande aumento (~20%) de íons ferrosos. Isto significa que a Cys foi capaz de reduzir parcialmente o ferro presente na bentonita. Este resultado é similar ao que ocorre com a aconitase onde íons ferro são reduzidos a Fe 2,5. Isto mostra que a Cys pode ter tido um papel importante na

química prebiótica, além de ser apenas um dos aminoácidos em peptídeos/proteínas.

Adsorção de bases nitrogenadas sobre argilas

O caulim adsorveu muito pouco da **A** em pH 2,00 e nenhuma das outras bases aqui estudadas foram adsorvidas por este mineral. Os resultados mostram que as bases **A** e **C** adsorvem mais sobre as argilas bentonita e montmorilonita do que as bases **U** e **T**. Estes resultados sugerem duas questões, ou melhor, apontam para dois problemas: a) o pH onde ocorreu a maior adsorção é muito baixo apesar de ocorrer em alguns hidrotermais, porém seriam eles muito comuns? e b) o outro problema é ainda pior, a ocorrência das bases nos seres vivos não tem a mesma relação encontrada neste experimento.

Uma análise das bases encontradas no DNA de diversos seres vivos mostra que a relação **A/T** é por volta de 1,00. Entretanto os resultados obtidos mostram que em qualquer situação a **A** é muito mais adsorvida que a **T** ou seja a relação **A/T** é muito maior do que um. Estes resultados levantam algumas questões sobre o papel dos minerais em fornecer um mecanismo para concentração de bases: Poderíamos esperar que a composição das bases nitrogenadas adsorvidas sobre minerais refletisse as dos DNA atuais? A adsorção de bases nitrogenadas sobre minerais foi importante para a origem da vida?

Os dados de infravermelho mostram que todas as bases interagem com as argilas através do grupo amina.

REFERÊNCIAS

Acros Organics, products Specifications, acesso em: 7 de fevereiro de 2007.
Disponível em: <http://www.acros.com/>

Andersson, E.; Holm, N. G.; The stability of some selected amino acids under attempted redox constrained hydrothermal conditions. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **2000**, 30, 9-23.

Appel, C.; Ma, L. Q.; Rhue, R. D.; Kennelley, E.; Point of zero charge destetermination in soils and minerals via traditional methods and detection of electroacoustic mobility. *Geoderma*. **2003**, 113, 77-93.

Aroca, R.; Bujalski, R.; Surface enhanced vibrational spectra of thymine. *Vibrational Spectroscopy*. **1999**, 19, 11-21.

Aryal, S.; Remant, B. K. C.; Dharmaraj, N.; Bhattarai, N.; Chi, H. K.; Hak, Y. K.; Spectroscopic indentification os S-Au interaction in cysteine capped gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A*. **2006**, 63, 160-163.

Aufdenkampe, A. K.; Hedges, J. I.; Richey, J. E.; Krusche, A. V.; Uerena, A. V.; Sorptive fractionation of dissolved organic nitrogen and aminoacids onto fine sediments within the Amazon Basin. *Limnology and Oceanography*. **2001**. 46: 1921-1935.

Basiuk, V. A.; Gromovoy, T. Yu.; Comparative study of amino acid adsorption on bare and octadecyl silica from water using high-performance liquid chromatography. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **1996**, 118, 127-140.

Basiuk, V. A.; *Adsorption of biomolecules on silica*. Em: *Encyclopedia of surface and colloid science*. Ponisseril Somassundaran (ed) Marcell Dekker Inc., New York, **2002**, p. 277.

Ben-Taleb, A.; Vera, P.; Delgado, A. V.; Gallardo, V.; Electrokinetic studies of monodisperse hematite particles of inorganic electrolytes and amino acids. *Materials Chemistry and Physics*. **1994**, 37: 68-75.

Bernal, J. D.; *The physical basis of life*; Londres: Routledge e Keagan Paul, **1951**.

Blocher, M.; Liu, D.; Walde, P.; Luisi, P. L.; Liposome assisted selective polycondensation of α -amino acids and peptides. *Macromolecules*. **1999**, 32, 7332-7334.

Blocher, M.; Liu, D.; Walde, P.; Luisi, P. L.; Liposome assisted selective polycondensation of α -amino acids and peptides: the case of charged liposomes. *Macromolecules*. **2000**. 33, 5787-5796.

Böhler, C.; Hill Jr., A. R., Orgel, L. E.; Catalysis of the oligomerization of o-phospho-serine, aspartic or glutamic acid by cationic micelles. *Origim of Life and Evolution of the Biosphere*. **1996**. 26, 1-5.

Borchardt, G.; *Smectites*. Em: Dixon, J. B.; Weed, S. B.; (eds). Minerals in Soil Environments. 2. ed. Madison, Soil Science Society of America. p 675-727. **1989**.

Bujdák, J.; Rode, B. M.; Activated alumina as an energy source for peptide bound formation: consequences for mineral mediated prebiotic processes. *Amino Acids*. **2001**, 21, 281-291.

Cairns-Smith, A. G.; *Genetic takeover and the mineral origins of life*, Cambridge University Press. **1982**.

Cohn, C. A.; Hansson, T. K.; Larsson, H. S.; Sowerby, S. J.; Holm, N. G.; Fate of prebiotic adenine. *Astrobiology*. **2001**, 1, 4, 477-480

Churchill, H.; Teng, H.; Hazen, R. M.; Correlation of pH-dependent surface interaction forces to amino acid adsorption: implications for the origin of life. *American Mineralogist*. **2004**. 89, 1048–1055

Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberly, S. E.; *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Academic Press. New York, **1964**.

Cowan, J. A.; *Inorganic biochemistry an introduction*. VCH Publishers, Inc. New York, p. 154-155, **1993**.

Cronin, J. R.; Clues from the origin of the solar system: meteorites, Em: Brack, A.; (ed.), *The molecular origins of life: assembling pieces of the puzzle*, Cambridge University Press, p 119–146, **1998**.

Darnell, J.; Lodish. H.; Baltimore, D.; *Molecular cell biology*. Scientific American Books, New York, p 48, **1990**.

Ding, X.; Henrichs, S. M.; Adsorption and desorption of proteins and poly aminoacids by clay minerals and marine sediments. *Marine Chemistry*. **2002**, 77, 225-237.

Dose, K.; Peptides and amino acids in the primordial hydrosphere. *BioSystems*. **1975**, 6, 224-228.

Dyson, F.; *Origins of life*; Cambridge: Editora Universidade Cambridge, **1985**.

Ferris, J. P.; Joshi, P. C.; Edelson, E. H.; Lawless, J. G.; HCN: A plausible source of purines, pyrimidines and amino acids on the primitive earth. *Journal of Molecular Evolution*. **1978**, 11, 293-311.

Ferris, J. P.; Hagan, W. J.; HCN and chemical evolution: the possible role of cyano compounds in prebiotic synthesis. *Tetrahedron*. **1984**, 40, 1093-1120.

Ferris, J. P.; Catalysis and prebiotic RNA synthesis. *Origins Life and Evolution of the Biosphere*. **1993**, 23, 307-315.

Fisher, L. J. ; Buting, S. L. ; Rosenberg, L. E. ; A modified ninhydrin colorimetric method for the determination of plasma alpha-amino nitrogen. *Clinical Chemistry*. **1963**, 9, 573-581.

Franchi, M.; Ferris, J. P.; Gallori, E.; Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **2003**, 33, 1–16,.

Grzegorzczuk, D. S.; Carta, G.; Adsorption of amino acids on porous polymeric adsorbents 1 equilibrium. *Chemical Engineering Science* **1996**, 51, 807-817.

Hartman, H. Speculation on the origin and evolution of metabolism. *Journal of Molecular Evolution*. **1975**, 4, 359-370.

Heckl, W. M.; Smith, D. P. E.; Binnig, G.; Klagges, H.; Hänsch, T. W.; Maddocks, J.; Two dimensional ordering of the DNA base guanine observed by scanning tunneling microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **1991**, 88, 8003–8005.

Hennet, R. J. C.; Holm, N. G.; Engel, M. H.; Abiotic synthesis of amino acids under hydrothermal conditions and the origin of life: A perpetual phenomenon?. *Naturwissenschaften*. **1992**, 79, 361–365.

Henrichs S. M.; Sugai S. F.; Adsorption of amino acids and glucose by sediments of Resurrection Bay, Alaska, USA-Functional groups effects. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1993**, 57, 823–835.

Holm, N. G.; Dowler, M. J.; Wadsten, T.; Arrhenius, G.; β -FeOOH. Cl_n (akaganéite) and Fe_{1-x}O (wüstite) in hot brine from Atlantis II Deep (Red Sea) and uptake of aminoacids by syntentic β -FeOOH. Cl_n . *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **1983**, 47, 1465-1470.

Kalra, S.; Pant, C. K.; Pathak, H. D.; Mehta, M. S.; Adsorption of glycine and alanine on montmorillonite with or without coordinated divalent cations. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. **2000**, 37, 341-346.

Kaschke, M.; Russel, M. J.; Cole, W. J.; $[\text{FeS}/\text{FeS}_2]$ A redox system for the origin of life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **1994**, 24, 43-56.

Klapper, M. H.; Independent distribution of amino acids near neighbor pairs into polypeptides. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **1977**, 78, 1018-1024.

Komiyama, M.; Shimaguchi, T.; Gu, M.; Wu, H. M.; Okada, T.; Adlayer formation of DNA base cytosine over natural zeolite heulandite (010) surface by AFM. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*. **1998**, 66, 635-637.

Lahav, N.; Chang, S.; The possible role of solid surface area in condensation reactions during chemical evolution. *Journal of Molecular Evolution*. **1976**, 8, 357-380.

Lahav, N.; Minerals and the origin of life: Hypotheses and experiments in heterogeneous chemistry. *Heterogenous Chemical Reviews*. **1994**, 1, 159-179.

Lehninger, A. L.; *Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, Cap 4, **1976**.

Lehninger, A. L.; *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier. p 574. **1984**,

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M.: *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers, p 113, **1993**.

Levy, M.; Miller, S. L.; Brinton, K; Bada, J. L.; Prebiotic synthesis of adenine and amino acids under Europa – like conditions. *Icarus*. **2000**, 145, 609–613.

Lewandowski, W.; Kalinowska, M.; Lewandowska, H.; The influence of halogens on the electronic system of biologically important ligands: spectroscopic study of halogenobenzoic acids, halogenobenzoates and 5-halogenouracils. *Inorganica Chimica Acta*. **2005**, 358, 2155-2166.

Lide, D. R.; *CRC Handbook of chemistry and physics*. 78 ed. New York: CRC Press, Inc, **1998**.

Luisi, P. L.; Walde, P.; Blocher, M.; Liu, D.; Research on the origim of life: membrane assisted polycondensation of amino acids and peptides. *Chimia*. **2000**, 54, 52-53.

Martusevičius, S.; Niaura, G.; Talaikytė, Z.; Razumas, V.; Adsorption of L-histidine on copper surface as evidence by surface enhanced Ramam scattering spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. **1996**, 10, 271-280.

Mellersh, A.; Wilkinson, A. S.; RNA bound to a solid phase can select an amino acid and facilitate subsequent amide bond formation. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **2000**, 30, 3-7.

Menck, C. F.; Oliveira, M. C.; O mundo do RNA e a origem da complexidade da vida. Em: Sérgio Mاتيoli (Org). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora Ltda – ME, p 11-14, **2001**.

Meng, M.; Stievano, L.; Lambert, J. F.; Adsorption and thermal condensation mechanisms of amino acids on oxide supports. 1. Glycine on silica. *Langmuir*. **2004**, 20, 914-923.

Meurer, E. J.; *Fundamentos de Química do solo*. 1.ed. Porto Alegre: Gênese, **2000**.

Miller, S. L.; A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*. **1953**, 117, 528-529.

Miller, S. L.; Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth?. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* LII. **1987**, 17-27.

Mojzsis, S. J.; Arrhenius, G.; McKeegan, K. D.; Evidence for life on earth before 3,800 million years ago. *Nature*. **1996**, 384, 55-59.

Montluçon, D. B.; Lee, C.: Factors affecting lysine sorption in a coastal sediment. *Organic Geochemistry*. **2001**, 32, 933-942.

Moore, D. M.; Reynolds Jr, R. C.; *X-ray diffraction and the identification and analysis of clay minerals*. 2 ed. New York: Oxford University Press, p 378, **1989**.

Nabiev, I. R.; Savchenko, V. A.; Efremov, E. S.; Surface enhanced Raman spectra of aromatic amino acids and proteins adsorbed by silver hydrosols. *Journal of Raman Spectroscopy*. **1983**, 14, 375-379.

Namasivayam, C.; Sangeetha, D.; Kinetic studies of adsorption of thiocyanate onto ZnCl₂ activated carbon from coir pith, an agricultural solid waste. *Chemosphere*. **2005**, 60, 1616-1623.

Oliveira, L. C. A.; Rios, R. V. R. A.; Fabris, J. D.; Sapag, K.; Garg, V. K.; Lago, R. M.; Clay-iron oxide magnetic composites for the adsorption of contaminants in water. *Applied Clay Science*. **2003**, 22, 169-177.

Oparin A. I.; *Origin of Life*; Nova Iorque: Editora Dover, **1953**.

- Oró, J.; Synthesis of adenine from ammonium cyanide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1960**, 2, 407-412.
- Paecht-Horowitz, M.; Clay catalysed polymerization of amino acid adenylates and its relationship to biochemical reactions. *Origin of Life*. **1978**, 289-295.
- Parks, G. A.; Aqueous surface chemistry of oxides and complex oxide minerals. Iso-electric point and zero point of charge. Em: Stumm, W.; (ed.). *Equilibrium concepts in natural water systems*. Washington D.C., Advanced in Chemistry series, 67, 121-160. **1967**.
- Pawlukojé, A.; Leciejewics, J.; Ramirez-Cuesta, A. J.; Nowicka-Scheibe, J.; L-cysteine: Neutron spectroscopy, Ramam, IR and ab initio study. *Spectrochimica Acta Part A*. **2005**, 61, 2474-2481.
- Perezgasga, L.; Serrato-Díaz, A.; Negrón-Mendoza, A.; De Pablo Galán, L.; Mosqueira, F. G.; Sites of adsorption of adenine, uracil, and their corresponding derivatives on sodium montmorillonite. *Origins of Life And Evolution of the Biospheres*. **2005**, 35, 91–110
- Plankensteiner, K.; Righi, A.; Rode, B. M.; Glycine and diglycine as possible catalytic factors in the prebiotic evolution of peptides. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **2002**, 32, 225-236.
- Prabakar, K. J.; Ferris, J. P.; Adenine derivatives as phosphate-activating groups for the regioselective formation of 30, 50-linked oligoadenylates on montmorillonite: possible phosphate activating groups for the prebiotic synthesis of RNA. *Journal of the American Chemical Society*. **1997**, 119, 4330–4337.
- Rao, M.; Odom, D. G.; Oró, J.; Clays in prebiological chemistry. *Journal of Molecular Evolution*. **1980**, 15, 317-331.
- Rogacheva, N. V.; Bobyrenko, Yu. Ya.; Adsorption of some amino acids on titanium dioxide surface. *Russian Journal of Physical Chemistry*. **1985**, 59, 769-770.
- Reynolds Jr., R. C.; *Clay minerals and the origin of life*. Em: Cairn-Smith, A. G.; Hartman, H.; (eds)., Cambridge: Cambridge University Press, p 46, **1988**.

Santana, H de; Toni, L. R. M.; Benetoli, L. O. B.; Zaia, C. T. B. V.; Rosa Jr., M.; Zaia, D. A. M.; Effect in glyphosate adsorption on clays and soils heated and characterization by FT-IR Spectroscopy. *Geoderma*. **2006**, 136, 738-750.

Saffarian, H. M.; Srinivasan, R.; Chu, D.; Gilman, S.; Effect of adsorbed uracil and its derivatives on the rate of oxygen reduction on platinum in acid electrolytes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **2001**, 504, 217-224.

Shapiro, R.; The prebiotic role of adenine – A critical analysis. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **1995**, 25, 83–98.

Shapiro, R.; A replicator was not involved in the origin of life. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life*. **2000**, 49, 173-176.

Sodré, F. F.; Lenzi, E.; Costa, A. C. S. da; Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. *Química nova*. **2001**, 24, 3, 324-330.

Sowerby, S. J.; Heckl, W. M.; Petersen, G. B.; Chiral symmetry breaking during the self assembly of monolayers from achiral purine molecules. *Journal of Molecular Evolution*. **1996**, 43, 419–424.

Sowerby, S. J.; Petersen, G. B.; Scanning tunneling microscopy of uracil monolayers self-assembled at the solid/liquid interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **1997**, 433, 85–90.

Sowerby, S. J.; Petersen, G. B.; Scanning tunnelling microscopy and molecular modelling of xanthine monolayers self-assembled at the solid-liquid interface: relevance to the origin of life. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **1999**, 29, 597–614.

Sowerby, S. J.; Stockwell, P. A.; Heckl, W. M.; Petersen, G. B.; ‘Self-programmable, self assembling two-dimensional genetic matter. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **2000**, 30, 81–99..

Sowerby, S. J.; Cohn, C. A.; Heckl, W. M.; Holm, N. G.; Differential adsorption of nucleic bases: relevance to the origin of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **2001a**, 98, 820–822.

Sowerby, S. J.; Mörth, C. M.; Holm, N. G; Effect of Temperature on the Adsorption of Adenine. *Astrobiology*. **2001b**, 1, 4 , 481 -487

Sowerby, S. J.; Petersen, G. B.; Holm, N. G.; Primordial condensing of amino acids by purine bases. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **2002a**, 32, 35–46.

Sowerby, S. J.; Petersen, G. B.; Life Before RNA. *Astrobiology*. **2002b**, 2, 3, 231-239.

Srinivasan, R.; Murphy, J. C.; Fainchtein, R.; Pattibiraman, N.; Electrochemical STM of condensed guanine on graphite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **1991**, 312, 293–300.

Stewart, S.; Fredericks, P. M.; Surface enhanced Raman spectroscopy of amino acids on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochimica Acta Part A*. **1999**, 55, 1641-1660.

Suh, J. S.; Moskovits, M.; Surface enhanced Raman spectroscopy of amino acids nucleotide bases adsorbed on silver. *Journal of the American Chemical Society*. **1986**, 108, 4711-4718.

Suwannachot, Y.; Rode, B. M.; Mutual amino acid catalysis in salt induced peptide formation support this mechanism's role in prebiotic peptide evolution. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **1999**, 29, 463-471.

Tanaka, H., Miyajima, K., Nakagaki, M., Shimabay, S.: Interaction of aspartic acid, alanine and lysine with hydroxyapatite. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **1989**, 37, 2897-2901.

Tao, N. J.; Derose, J. A.; Lindsay, S. M.; Self-assembly of molecular superstructures by in situ scanning tunneling microscopy: DNA bases on Au(111). *Journal of physical chemistry*. **1993**, 97, 910-919.

Wächtershäuser, G.; Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiological Reviews*, **1988**, 52, 452-484.

White, D. H.; Kennedy, R. M.; Macklin, J.; Acyl silicates aluminates as activated intermediates in peptide formation on clays. *Origin of Life*. **1984**, 14, 273-278.

Whitting, L. D.; Allardice, W. R. X-ray diffraction techniques. Em: Klute, A.; (ed.). *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods*. 2. ed. Madison, American Society of Agronomy, **1986**, p.331-362.

Winter, D.; Zubay, G.; Binding of adenine and adenine-related compounds to the clay montmorillonite and the mineral hydroxylapatite. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. **1995**, 25, 61-81

Wolpert, M.; Hellwig, P.; Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in the spectral range from 1800 to 500 cm⁻¹. *Spectrochimica Acta Part A*. **2006**, 64, 987-1001.

Yamada, T.; Shirasaka, K.; Takano, A.; Kawai, M.; Adsorption of cytosine, thymine, guanine and adenine on Cu(110) studied infrared reflection absorption spectroscopy. *Surface Science*. **2004**, 561, 233-347.

Yanagawa. H.; Kojima, K.; Ito, M.; Handa, N.; Synthesis of polypeptides by microwave heating I. Formation of polypeptides during repeated hydration/dehydration cycles and their characterization. *Journal of Molecular Evolution*. **1990**, 31, 180-186.

Zaia, D. A. M.; Ribas, K. C. L.; Zaia, C. T. B. V.; Spectrophotometric determination of cysteine and/or carbocysteine in a mixture of amino acids, shampoo, and pharmaceutical products using p-benzoquinone. *Talanta*. **1999**, 50, 1003-1010.

Zaia D. A. M.; Vieira, H. J.; Zaia, C. T. B. V.; Adsorption of L-amino acids on sea sand. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2002**, 13, 679-681.

Zaia, D. A. M.; A review of adsorption of amino acidson minerals: was it important for origin of life? *Amino Acids*. **2004**, 27, 113-118.

Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Adsorption of amino acids on minerals and the origin of life. *Química Nova*. **2006**, 29, 786-789.